



**Tiago Filipe Mota Vieira**

Licenciatura em Bioquímica

## **Identificação de um Potencial Biomarcador de Malária**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Genética  
Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutora Catarina Maria Roma Rodrigues,  
UCIBIO, FCT/UNL

Co-orientador: Professor Doutor José Ricardo Ramos  
Franco Tavares, UCIBIO, FCT/UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro, 2016**





**Tiago Filipe Mota Vieira**

Licenciatura em Bioquímica

## **Identificação de um Potencial Biomarcador de Malária**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Genética  
Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutora Catarina Maria Roma Rodrigues,  
UCIBIO, FCT/UNL

Co - orientador: Professor Doutor José Ricardo Ramos  
Franco Tavares, UCIBIO, FCT/UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro, 2016**



## **Identificação de um Potencial Biomarcador de Malária**

Copyright © em nome de Tiago Filipe Mota Vieira, da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de deixar um especial agradecimento ao Professor Doutor Ricardo Franco, por me ter acolhido no BionanoLab e ter proporcionado a oportunidade de realizar a minha dissertação de mestrado no seu laboratório de investigação, neste tema de elevada importância e interesse.

Gostaria também de agradecer à Doutora Inês Gomes pela sua incansável atenção, paciência e apoio, que se revelaram indispensáveis para a conclusão deste projeto, não só na sua execução, mas também na articulação das diferentes afiliações que trabalharam em conjunto para este objetivo.

Quero também agradecer à minha orientadora Doutora Catarina Roma Rodrigues e à Professora Doutora Alexandra Fernandes, pela sua contribuição e apoio indispensáveis para a realização dos objetivos propostos por este projeto, assim como a sua prontidão para toda a ajuda necessária.

Ao Doutor Miguel Prudêncio, do Instituto de Medicina Molecular (IMM), pela cedência de amostras indispensáveis para este projeto, assim como a disponibilidade e prontidão para ajuda demonstradas desde o início deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

À Doutora Fátima Nogueira, Lis Coelho, Doutor Marcelo Silva, Doutor Jaime Nina e Doutora Ana Reis e ao conselho ético do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), manifesto a minha imensa gratidão pela cedência de amostras indispensáveis para a realização deste projeto e constante preocupação e ajuda para o melhor rumo deste trabalho.

Ao Doutor Hugo Osório, do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular do Porto (IPATIMUP), pela sua inestimável participação, disponibilidade e preocupação demonstradas ao longo deste projeto.

À minha irmã e aos meus pais deixo um especial e eterno agradecimento por todo o apoio que sempre me deram, e por me terem permitido e incentivado lutar pelos meus sonhos. Obrigado!

À minha namorada Carolina, por mesmo sem nem sempre entender bem o que faço, sempre ter acreditado em mim, e me ter apoiado incondicionalmente.

A todos os familiares e amigos, que estiveram sempre disponíveis, e que com a sua infinita ajuda, paciência, incentivo, ou apenas com um sorriso, tornaram este projeto possível e mais fácil. Um sincero Obrigado!

Por último, mas não menos importante, um obrigado especial ao meu cão Lucas, pelo seu apoio incondicional.





## Resumo

Em 2015, estima-se tenham existido entre 149-303 milhões casos de malária, e mortes associadas entre 236 000-635 000. A infeção é causada por parasitas do género *Plasmodium*, particularmente a espécie *P. falciparum*. O diagnóstico apropriado aumentou bastante desde 2005, principalmente devido aos testes diagnóstico rápido (RDTs). A sensibilidade destes RDTs apresenta variações significativas entre as populações onde a malária é considerada endémica. É urgente um RDT com elevada precisão, sensibilidade e custo reduzido, permitindo a deteção de níveis de parasitemia de 100 parasitas/ $\mu$ L, sendo a identificação de biomarcadores de malária um factor-chave.

Os objetivos deste projeto foram: 1) optimização do protocolo de separação proteínas de amostras de soro humano, via electroforese bidimensional (2-DE), e 2) identificação de antígenos específicos de parasitas de malária (biomarcadores) em amostras infetadas pelo *Plasmodium*. A estratégia focou-se na depleção de albumina, a proteína sérica humana mais abundante, conseguida pela utilização de membranas com um limite de exclusão molecular de 50 kDa, lavadas em solução de tampão fosfato de sódio. As restantes proteínas foram separadas através de 2-DE. Foi comparado o padrão proteico das amostras de indivíduo saudável (controlo), com as de indivíduos com infeções ativas de malária ou com historial clínico desta infeção. Proteínas apenas expressas nestas amostras, ou com variações específicas nos seus níveis de expressão são potenciais biomarcadores desta doença, identificadas por MS.

Foram identificadas sete proteínas com variações significativas nos níveis de expressão, duas apenas identificadas nas amostras infetadas e nove spots proteicos com variações significativas na sua expressão (não identificadas por MS). Neste projeto foram identificadas proteínas a utilizar como biomarcadores no diagnóstico de malária, com o objetivo de controlar e erradicar globalmente esta infeção.

**Keywords:** Malária; Biomarcador; Electroforese Bidimensional; Espectrometria de Massa; Análise Proteómica



## Abstract

In 2015 there were 149-303 million estimated cases of malaria, with 236000-635000 associated deaths. Malaria infection is caused by the parasite from the *Plasmodium* genre, particularly by the *P. falciparum* specie. The correct diagnostic of this disease significantly increased since 2005, mainly due to rapid diagnostic tests (RDTs). The sensitivity from this RDTs shows significant variations between different populations and regions where malaria is still considered endemic. Therefore, there is an urgent need for an RDT with high accuracy and sensitivity levels, and reduced cost that can at least detect parasite levels of 100 parasites/ $\mu$ L, being the identification of malaria infection biomarkers a key-factor.

The main objectives of this project were: 1) optimization of the protocol for the separation of the different proteins from human serum samples, achieved by two-dimensional electrophoresis (2-DE) and 2): identification of specific parasite antigens (biomarkers) from malaria infection in *P. falciparum* infected samples. The followed strategy focused on the depletion of albumin from the samples, the most abundant human serum protein, achieved with the utilization of membranes with a molecular weight cut-off of 50 kDa, followed by washing with phosphate-sodium buffer. The remaining proteins were separated by 2-DE. We compared the protein pattern from healthy individual sample (control) with samples from individuals infected with malaria or with clinical history of this infection. Proteins that were only expressed in this compared samples, or that showed significant variations on their expression levels are potential biomarkers for malaria infection, and were identified by mass spectrometry (MS).

Seven proteins that showed significant changes on their expression levels through the different samples were identified, along with two proteins only identified on the infected samples. We also found nine proteins that showed significant variations on their expression levels, but their identification by MS was not possible. In this project, we identified several proteins that show potential to be used as biomarkers for the diagnostic of malaria infections, with the ultimate purpose being the control and global elimination of this disease.

**Keywords:** Malaria; Biomarker; 2-D Electrophoresis; Mass Spectrometry; Proteomic Analysis



## Índice Geral

Agradecimentos.....	I
Resumo .....	III
Abstract .....	V
Índice Geral .....	VII
Índice de Figuras .....	X
Índice de Tabelas .....	XIX
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	XXI
1. Introdução.....	1
1.1. Malária .....	3
1.1.1. A Doença .....	3
1.1.2. Incidência e Distribuição Geográfica .....	4
1.1.3. Medidas de Controlo .....	6
1.2. <i>Plasmodium falciparum</i> .....	12
1.2.1. Ciclo de Vida .....	12
1.2.2. Proteoma de <i>Plasmodium</i> .....	14
1.3. Diagnóstico de Malária .....	16
1.3.1. Diagnóstico de Malária - Métodos Diretos .....	18
1.3.2. Diagnóstico de Malária - Métodos Indiretos .....	21
1.4. Biomarcadores de Malária .....	24
1.4.1. Proteína Rica em Histidina II, de <i>P. Falciparum</i> (PfHRPII) .....	25
1.4.2. Proteína de Choque Térmico 70, de <i>P. falciparum</i> (PfHsp70).....	26
1.4.3. LDH e Aldolase.....	27
1.5. Objetivos.....	29
1.6. Principais Técnicas Utilizadas .....	29
1.6.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE).....	30
1.6.2. Eletroforese Bidimensional (2DE) .....	32
1.6.3. Análise de Padrões de Spots Proteicos, Obtidos por Eletroforese Bidimensional (2DE), Através do Software Melanie 7.0.....	35

1.6.4.	Análise por Espectrometria de Massa (MS).....	36
1.6.5.	Identificação Das Proteínas Analisadas Por Espectrometria De Massa – <i>Peptide Mass Fingerprint</i> .....	37
2.	Materiais e Métodos .....	39
2.1.	Amostras Analisadas.....	41
2.1.1.	Amostras de Sangue Total, Soro e Plasma Humano .....	42
2.1.2.	Amostras de Sobrenadantes de Cultura de Eritrócitos Não Infetada e Infetada com <i>Plasmodium falciparum</i> , com um nível de parasitemia de 10% (cedidas pelo IMM) ..	42
2.1.3.	Amostras de Sobrenadantes de Cultura de Eritrócitos Não Infetada e Infetada com <i>Plasmodium falciparum</i> , com um nível de parasitemia de 20% e 22% (cedidas pelo IHMT).....	42
2.1.4.	Amostras de Soro Humano de Indivíduo Saudável, Indivíduo Saudável com Historial Clínico de Malária e Indivíduo Infetado com Malária Aguda de <i>P. falciparum</i> (cedidas pelo IHMT) .....	44
2.1.5.	Amostras de Plasma Humano de Indivíduos Saudáveis, com ou sem Historial Clínico de Malária, e de Indivíduo com Infecção de Malária de <i>P. falciparum</i> (cedidas pelo IHMT) .....	44
2.2.	Tratamento das Amostras .....	45
2.2.1.	Adição De Diferentes Percentagens de Dodecil-Sulfato de Sódio (SDS) .....	45
2.2.2.	Depleção das Proteínas de Maior Abundância e Peso Molecular .....	46
2.3.	Eletroforese Bidimensional.....	52
2.3.1.	Preparação Das Amostras Para Eletroforese Bidimensional – <i>2D Clean Up Kit</i> .....	52
2.3.2.	Focagem Isoelétrica Das Amostras – 1ª Dimensão Da Eletroforese Bidimensional .....	54
2.3.3.	Eletroforese Em Gel de Poliacrilamida, Em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE) – 2ª Dimensão da Eletroforese Bidimensional.....	55
2.4.	Análise Dos Padrões De <i>Spots</i> De Proteínas, Obtidos pela Técnica de Eletroforese Bidimensional, Através do <i>Software Melanie 7.0, GeneBio</i> .....	56
2.5.	Análise Dos <i>Spots</i> de Interesse – Análise Por Espectrometria De Massa (MALDI-TOF/TOF MS/MS) .....	57
2.6.	Identificação Das Proteínas Analisadas Por Espectrometria De Massa (MALDI-TOF/TOF MS/MS) – <i>Peptide Mass Fingerprint</i> .....	58
2.7.	Técnicas Gerais.....	58
2.7.1.	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE).....	58

2.7.2.	Coloração De Géis De Poliacrilamida Com Nitrato De Prata (AgNO <sub>3</sub> ) - <i>PlusOne Silver Staining Kit</i> .....	60
2.7.3.	Quantificação De Proteínas Das Amostras – <i>Pierce 660nm Protein Assay Kit</i> ..	61
3.	Resultados e Discussão .....	63
3.1.	Tratamento das Amostras .....	65
3.1.1.	Sobrenadantes de Culturas de Eritrócitos, cedidas pelo IMM e IHMT .....	65
3.1.2.	Soros Humanos, de Indivíduo Saudável, Saudável com Historial Clínico de Malária, e Infetado com malária de <i>P. falciparum</i> , cedidas pelo IHMT.....	73
3.2.	Eletroforese Bidimensional.....	76
3.3.	Análise Dos Padrões De <i>Spots</i> De Proteínas, Obtidos pela Técnica de Eletroforese Bidimensional, através do <i>Software Melanie 7.0, GeneBio</i> .....	79
3.4.	Análise Dos <i>Spots</i> de Interesse – Análise Por Espectrometria De Massa (MALDI-TOF/TOF MS/MS) .....	81
3.5.	Identificação Das Proteínas Analisadas Por Espectrometria De Massa (MALDI-TOF/TOF MS/MS) – <i>Peptide Mass Fingerprint</i> .....	81
4.	Conclusões e Perspectivas Futuras.....	97
4.1.	Tratamento das Amostras, Tendo em Vista a Remoção das Proteínas de Maior Abundância Relativa e Maior Peso Molecular, Nomeadamente Albumina .....	99
4.2.	Identificação dos <i>Spots</i> Proteicos Excisados, Analisados por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF/TOF MS/MS), e Identificados Através da Técnica de <i>Peptide Mass Fingerprint</i> .....	100
4.3.	Perspectivas Futuras.....	102
5.	Bibliografia.....	103
6.	Anexos.....	115

## Índice de Figuras



**Figura 1.1.** Representação gráfica dos dados referentes à mortalidade por malária importada, em Portugal Continental, no período compreendido entre 1960-2012. Adaptado de Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas, Maio-Agosto 2014.....4

**Figura 1.2.** Representação dos países com transmissão ativa de malária, no período compreendido entre 2000-2015. A laranja estão representados os países nos quais a malária é considerada endémica. A verde estão representados os países em que no ano de 2000, a malária era considerada endémica, mas que em 2015 já não o são. A branco estão representados os países em que não existe transmissão ativa de malária, nem esta doença é considerada endémica. A cinzento estão representados os países para os quais os dados obtidos não são aplicáveis. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde.....5

**Figura 1.3.** Representação gráfica das principais causas de morte de crianças com idade inferior a 5 anos, na região da África Subsariana, no período compreendido entre 2000-2015. Os dados representados refletem o número de mortes por cada 1000 nascimentos. A vermelho estão representados os óbitos causados por malária. A azul claro os óbitos causados por asfixia ou trauma aquando o nascimento. A azul estão representados os óbitos devidos a doenças relacionadas com diarreia. A azul escuro estão representados os óbitos causados por a doença de sarampo. A laranja estão representados os óbitos que ocorreram prematuramente. A amarelo estão representados os óbitos causados por infeções respiratórias agudas. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde. ....6

**Figura 1.4.** Representação gráfica da redução global do índice de mortalidade da malária, globalmente, no período compreendido entre 2000-2015. Os dados apresentados são referentes à taxa de incidência e índice de mortalidade de malária, sendo os valores apresentados correspondentes ao número de casos de malária por cada 1000 pessoas em risco de contrair a infecção, e ao número de mortes causadas por malária, por cada 100 000 habitantes, respectivamente. A azul está representada a incidência de malária, que no período acima referido, sofreu um decréscimo de 37%. A vermelho está representado o índice de mortalidade causado pela doença, que no mesmo período de 15 anos sofreu um decréscimo de 60%. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde. ....7

**Figura 1.5.** Valores de investimentos em ações para o controlo da doença da malária, obtidos através de fontes de financiamento, no período compreendido entre 2005-2014. Os valores apresentados são relativos a milhões de dólares (USD). Estão representados as seguintes fontes de financiamento: Programas nacionais de controlo de malária (verde), *Global Fund to Fight AIDS, TB and Malaria* (azul claro), o Banco Mundial (azul escuro), os Estados Unidos da América (amarelo), o Reino Unido (laranja), o *Affordable Medicine Facility-Malaria* (AMFm) (vermelho) e outros financiadores, a castanho. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde. ....8

**Figura 1.6.** Representação das estimativas, da OMS, do número de mortes causadas por malária, que foram evitados através de ações de controlo da doença, num período compreendido entre 2001-2013. A legenda da figura encontra-se indicada, e os valores correspondem ao número de mortes evitadas estimado. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2014, Organização Mundial de Saúde. ....9

**Figura 1.7.** Representação gráfica do número estimado, e acumulado, de casos de malária que foram evitados através de intervenções para o controlo da doença. Os valores apresentados são de milhões de casos evitados. A azul claro, aparecem os casos evitados através de redes mosquiteiras tratadas com insecticida. A azul estão indicados os casos evitados através da utilização de terapias combinadas à base de artemisinina. A azul escuro estão representados os casos evitados através de *sprays* residuais de insecticida. A vermelho aparecem representados a totalidade dos casos evitados, através do três métodos acima referidos. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde. ....10

**Figura 1.8.** Representação das estimativas, da OMS, da variação, em percentagem, da taxa de mortalidade causada por malária, no período compreendido entre 2000-2013. A legenda da

figura encontra-se indicada, sendo os valores atribuídos de acordo com a variação apresentada. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2014, Organização Mundial de Saúde. ....11

**Figura 1.9.** Representação esquemática do ciclo de vida do parasita do género *Plasmodium spp.*. Estão também representadas as diversas etapas das duas fases de reprodução do ciclo de vida deste organismo: a fase de reprodução assexuada, que ocorre em animais vertebrados, como o ser humano, e a fase de reprodução sexuada, que ocorre no mosquito fêmea da espécie *Anopheles spp.*. Adaptado de Pasvol, 2010. ....13

**Figura 1.10.** Representação gráfica da proporção de casos de malária, que foram registados por serviços públicos de saúde, aos quais foi efectuado um teste de diagnóstico da infecção, por região da OMS, no período compreendido entre 2005-2014. A cinzento estão representados todos os casos registados globalmente. A azul claro estão representados os casos que ocorreram na região Africana. A azul estão representados os casos que foram registados na região das Américas. A azul escuro estão representados os casos que ocorreram na região mediterrânea da Europa. A amarelo aparecem representados os casos que aconteceram na Europa. A castanho estão representados os casos que foram registados na região do Sudoeste Asiático. A vermelho aparecem os casos ocorridos na região do Pacífico Este. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde. ....17

**Figura 1.11.** Representação esquemática das principais etapas de uma análise por espectrometria de massa. As amostras são injetadas, e as moléculas são ionizadas e aceleradas. Estes iões são separados, de acordo com a sua razão massa / carga ( $m/z$ ), sendo estes posteriormente detectados e amplificados. Após a amplificação de sinal, são originados dados acerca da abundância relativa de cada ião, baseando-se novamente na sua razão  $m/z$ . Adaptado de *Overview of Mass Spectrometry for Protein Analysis* – ThermoScientif, 2015. ....24

**Figura 1.12.** Representação do modelo teórico da estrutura tridimensional da proteína PfHRPII (*Histidine Rich Protein II*, de *P. falciparum*) (PDB: 1L8M). A representação foi gerada pelo programa *Chimera 1.9*. A azul estão representadas as hélices- $\alpha$ , e a laranja estão representadas as estruturas denominadas *random coils*. Adaptado de *Protein Data Bank* (1L8M), 2015. ....26

**Figura 1.13.** Representação do modelo teórico da estrutura tridimensional da enzima fructose-1,6-bifosfato aldolase, de *P. falciparum*). A imagem foi obtida através do PDB (1A5C). ....28

**Figura 1.14.** Representação do modelo teórico da estrutura tridimensional da enzima lactato desidrogenase (LDH) de *P. falciparum*. A imagem foi obtida através do PDB (1LDG). ....28

**Figura 1.15.** Representação da técnica de electroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE). As proteínas inseridas no gel, migram do polo negativo, para o polo positivo e, após a sua entrada no gel de corrida, ou separação, estas são separadas de acordo com o seu peso molecular. Moléculas de menor peso molecular migram mais, e vice-versa. Adaptado de *SDS-PAGE Gel Electrophoresis*, Chemistry Gatech, 2015. ....32

**Figura 1.16.** Esquema representativo da eletroforese 2D em gel de poliacrilamida (2D PAGE). O início do processo ocorre com a extração de proteínas a partir da amostra biológica de estudo de modo a obter uma amostra compatível com a etapa de focagem isoelectrica (A). A amostra é de seguida carregada numa tira de poliacrilamida com um gradiente de pH imobilizado (B1) que se encontra orientada com a zona ácida no ânodo, e a zona básica no cátodo. Durante a realização da focagem isoelectrica, a primeira dimensão, as proteínas migram até atingirem o seu ponto isoelectrico (pI) (B2). De seguida, a tira proveniente da primeira dimensão é equilibrada com um tampão que contém SDS, com o objectivo de garantir que todas as proteínas se tornam carregadas negativamente (C). A tira de poliacrilamida proveniente da etapa de focagem isoelectrica é então carregado num gel SDS-PAGE para dar início à segunda dimensão do processo de separação onde as proteínas serão separadas de acordo com o seu peso molecular (D). Adaptado de Rabilloud *et al*, 2002. ....33

**Figura 3.1.** Gel de electroforese SDS-PAGE (10% Poliacrilamida / 150V/ 135min) – As amostras inseridas nos diferentes poços são as seguintes: 1. 3 $\mu$ L Marcador de pesos

moleculares NZY Tech Protein Colour Marker II (11-245kDa); 2. 3µL Sangue Total; 3. 2µL Sangue Total; 4. 1,5µL Sangue Total; 6. 3µL Plasma; 7. 2µL Plasma; 8. 3µL Soro; 9. 1,5µL Soro; A legenda da figura é feita por: M – marcador; ST – sangue total; P – Plasma; S – Soro;

.....65

**Figura 3.2.** Gel SDS-PAGE (10% Poliacrilamida / 150V/ 61min) – 2. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 3. 1µL Sobrenadante de cultura de eritrócitos não infectados (IMM); 4. 0,5µL Sobrenadante de cultura de eritrócitos não infectados (IMM); 5. 1µL Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 10% (IMM); 6. 0,5µL Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 10% (IMM); 7. 1µL IHMT Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 22% (IHMT); 8. 0,5µL Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 22% (IHMT); IMM NF – Sobrenadante de cultura de eritrócitos não infectados (IMM); IMM *Pf*3D7 – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 10% (IMM); IHMT *Pf*3D7.22 – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 22% (IHMT); .....66

**Figura 3.3.** Géis SDS-PAGE (10% Poliacrilamida / 150V/ 65min). Às diferentes amostras foram adicionadas diferentes percentagens de SDS. As amostras inseridas nos poços foram as seguintes: A - 2. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 4. 20µL IHMT *Pf*3D7.20, com adição de 0,1% SDS; 6. 20µL IHMT *Pf*3D7.20, com adição de 0,2% SDS; 8. 20µL IHMT *Pf*3D7.20, com adição de 0,5% SDS; 10. 20µL IHMT *Pf*3D7.20; B - 2. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 4. 20µL IHMT *Pf*3D7.22, com adição de 0,1% SDS; 6. 20µL IHMT *Pf*3D7.22, com adição de 0,2% SDS; 8. 20µL IHMT *Pf*3D7.22, com adição de 0,5% SDS; 10. 20µL IHMT *Pf*3D7.22; IHMT *Pf*3D7.20 – Sobrenadante de cultura de eritrócitos Infectada por *P. falciparum*, da estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 20% (IHMT); IHMT *Pf*3D7.22 – Sobrenadante de cultura de eritrócitos Infectada por *P. falciparum*, da estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 22% (IHMT); .....67

**Figura 3.4.** Géis SDS-PAGE (10% Poliacrilamida / 150V/ 62min). Foram adicionadas a primeira e segunda fracções de amostra, que foram obtidas através da passagem das mesmas pelo sistema Amicon Ultra-0,5, com um limite de exclusão de peso molecular de 50 kDa. As amostras inseridas nos poços foram as seguintes: A - 1. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 2. 17µL IMM NF (Filtrado 1); 3. 19µL IMM NF (Filtrado 1); 4. 17µL IMM NF (Filtrado 2); 5. 19µL IMM NF (Filtrado 2); 6. 17µL IMM *Pf*3D7 (Filtrado 1); 7. 19µL IMM *Pf*3D7 (Filtrado 1); 8. 17µL IMM *Pf*3D7 (Filtrado 2); 9. 19µL IMM *Pf*3D7 (Filtrado 2); 10. 19µL IHMT *Pf*3D7.22 (Filtrado 2); B - 1. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 2. 17µL IHMT *Pf*3D7.20 (Filtrado 1); 3. 19µL IHMT *Pf*3D7.20 (Filtrado 1); 4. 17µL IHMT *Pf*3D7.20 (Filtrado 2); 5. 19µL IHMT *Pf*3D7.20 (Filtrado 2); 6. 17µL IHMT *Pf*3D7.22 (Filtrado 1); 7. 19µL IHMT *Pf*3D7.22 (Filtrado 1); 8. 17µL IHMT *Pf*3D7.22; IMM *Pf*3D7 – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 10% (IMM); IHMT *Pf*3D7.20 – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 20% (IHMT); IHMT *Pf*3D7.22 – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 22% (IHMT); .....69

**Figura 3.5.** Géis SDS-PAGE (10% Poliacrilamida / 150V/ 62min). Foram adicionados 1,5µg de conteúdo proteico de cada amostra. As amostras referidas como AAO, foram passadas primeiramente em Amicons Ultra-0,5 com um limite de exclusão de peso molecular de 50 kDa, e seguidamente pelo *kit AlbuminOut*, da G-Biosciences. As amostras referidas como AOA foram tratadas pelo processo inverso. As amostras inseridas nos diferentes poços foram as

seguintes: A - 1. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 2. IMM NF AAO; 3. IMM NF AOA; 4. IMM *Pf*3D7 AAO; 5. IMM *Pf*3D7 AOA; B - 1. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 2. IHMT NF AAO; 3. IHMT NF AOA; 4. IHMT *Pf*3D7.20 AAO; 5. IHMT *Pf*3D7.20 AOA; IMM NF – Sobrenadante de cultura de eritrócitos não infectados (IMM); IMM *Pf*3D7 – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 10% (IMM); IHMT *Pf*3D7.20 – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 20% (IHMT). ..... 71

**Figura 3.6.** Géis SDS-PAGE (10% Poliacrilamida / 150V/ 62min). Os géis foram corados com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>). Foram adicionados, no gel A, 0,5µg de quantidade de proteína de cada amostra, e 1µg no gel B. As amostras referidas como AAO, foram passadas primeiramente em Amicons Ultra-0,5 com um limite de exclusão de peso molecular de 50 kDa, e seguidamente pelo *kit AlbuminOut*, da G-Biosciences. As amostras referidas como AOA foram tratadas pelo processo inverso. As amostras inseridas nos diferentes poços foram as seguintes: A - 1. 3µL Marcador de pesos moleculares NZY Tech Protein Colour Marker II (11-245kDa); 3. IHMT NF AAO; 5. IHMT NF AOA; 7. IHMT *Pf*3D7.22 AAO; 9. IHMT *Pf*3D7.22 AOA; B - 2. 3µL Marcador de pesos moleculares NZY Tech Protein Colour Marker II (11-245kDa); 4. IHMT NF AA; 7. IHMT *Pf*3D7.22 AOA; IHMT NF – Sobrenadante de cultura de eritrócitos não infectados (IHMT); IHMT *Pf*3D7.22 – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 22% (IHMT); ..... 72

**Figura 3.7.** Géis SDS-PAGE (10% Poliacrilamida / 150V/ 70min). Foram adicionados 1µg de conteúdo proteico de cada amostra. As amostras referidas como AO, foram tratados com o *kit AlbuminOut*. As amostras referidas como AAO, foram passadas primeiramente em Amicons Ultra-0,5 com um limite de exclusão de peso molecular de 50 kDa, e seguidamente pelo *kit AlbuminOut*, da G-Biosciences. As amostras referidas como TFS foram tratadas com Amicons Ultra-0,5 50K, e posterior lavagem das colunas com 2x 400µL de tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,2. As amostras inseridas nos diferentes poços foram as seguintes: A - 1. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 2. SIS; 3. SIS AO; 4. SIS TFS 5mM pH 7,2; 5. SISHC; 6. SISHC AO; 7. SISHC TFS 5mM pH 7,2; 8. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); B - 1. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 2. SIIMA; 3. SIIMA AO; 4. SIIMA AAO; 5. SIIMA TFS 5mM pH 7,2; 6. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); SIS – Soro de indivíduo saudável (IHMT); SISHC – Soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária (IHMT); SIIMA – Soro de indivíduo infectado com malária aguda de *P. falciparum* (IHMT). ..... 75

**Figura 3.8.** Géis de poliacrilamida (10% Poliacrilamida / 30V (60min) / 100V (60min). Foram adicionados 80µg de conteúdo proteico de cada amostra. A figura A é referente à amostra de soro humano de um indivíduo saudável, e a figura B é referente à amostra de soro de um indivíduo infectado com malária aguda, causada por *P. falciparum*. Ambas as amostras foram tratadas através de Amicons Ultra-0,5 50K, seguido do *kit AlbuminOut*. ..... 78

**Figura 3.9.** Géis de poliacrilamida (10% Poliacrilamida / 30V (60min) / 100V (60min). Foram adicionados 200µg de conteúdo proteico de cada amostra. A figura A é referente à amostra de soro humano de um indivíduo saudável, a figura B é referente à amostra de soro humano de um indivíduo saudável, com historial clínico de malária e a figura C é referente à amostra de soro de um indivíduo infectado com malária aguda, causada por *P. falciparum*. As amostras foram tratadas através de Amicons Ultra-0,5 50K, com lavagem com 2x 400µL tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,2. ..... 79

**Figura 3.10.** Imagens dos diferentes padrões de *spots* proteicos, obtidos por electroforese bidimensional, após a análise feita através do *software Melanie 7.0*, GeneBio. A vermelho estão marcados os *spots* que foram tomados em conta para a análise dos perfis proteicos das diferentes amostras de soros humanos, cedidas pelo IHMT. A figura A é referente à amostra de soro humano de um indivíduo saudável, A figura B é referente à amostra de soro humano de

um indivíduo saudável, com historial clínico de malária. A figura C é referente à amostra de soro de um indivíduo infectado com malária aguda, causada por *P. falciparum*. Todas as amostras foram tratadas através de Amicons Ultra-0,5 50K, com lavagem com 2x 400µL tampão fosfato sódio 5mM pH 7,2. ....80

**Figura 3.11.** Representação dos 43 *spots* proteicos, do padrão de *spots* obtido pela técnica de electroforese bidimensional, da amostra de soro de um indivíduo infectado com malária aguda, causado por *P. falciparum*, que foram excisados, e enviados para análise por espectrometria de massa e posterior identificação por *Peptide Mass Fingerprint*. ....82

**Figura 3.12.** Representação dos 43 *spots* proteicos da amostra de soro de um indivíduo infectado com malária aguda, causado por *P. falciparum*, que foram excisados, e enviados para análise por espectrometria de massa, assim como a sua identificação, conseguida pela técnica de *Peptide Mass Fingerprint*. ....85

**Figura 3.13.** Representação de imagens tridimensionais referentes ao *spot* proteico identificado como ORM1, nos géis obtidos por electroforese bidimensional para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade de ORM1, correspondente a um *fold* de 1,754, indicativo de sobre-expressão desta proteína. ....86

**Figura 3.14.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados como APOA1, nos géis obtidos por electroforese bidimensional para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade de APOA1, correspondente a um *fold* de 0,349, indicativo de sub-expressão desta proteína. ....87

**Figura 3.15.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados como HP, nos géis obtidos por electroforese bidimensional para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade de HP, correspondente a um *fold* de 2,624, indicativo de sobre-expressão desta proteína. ....88

**Figura 3.16.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados como HP, nos géis obtidos por electroforese bidimensional para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade de HP, correspondente a um *fold* de 2,197, indicativo de sobre-expressão desta proteína. ....88

**Figura 3.17.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados como HP, nos géis obtidos por electroforese bidimensional para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade de HP, correspondente a um *fold* de 0,693, indicativo de sub-expressão desta proteína. ....89

**Figura 3.18.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados como IGKC, nos géis obtidos por electroforese bidimensional para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma

variação da quantidade de IGKC, correspondente a um *fold* de 0,367, indicativo de sub-expressão desta proteína. ....89

**Figura 3.19.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados como RBP4, nos géis obtidos por electroforese bidimensional para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade de RBP4, correspondente a um *fold* de 0,544, indicativo de sub-expressão desta proteína. ....90

**Figura 3.20.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por electroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 3,994, indicativo de sobre-expressão desta proteína. ....93

**Figura 3.21.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por electroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 1,929, indicativo de sobre-expressão desta proteína. ....93

**Figura 3.22.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por electroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 1,549, indicativo de sobre-expressão desta proteína. ....93

**Figura 3.23.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por electroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 0,672, indicativo de sub-expressão desta proteína. ....94

**Figura 3.24.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por electroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 0,490, indicativo de sub-expressão desta proteína. ....94

**Figura 3.25.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por electroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 0,481, indicativo de sub-expressão desta proteína. ....94

**Figura 3.26.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por electroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 0,355, indicativo de sub-expressão desta proteína. ....95

**Figura 3.27.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por electroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 0,263, indicativo de sub-expressão desta proteína. ....95

**Figura 3.28.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por electroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 0,157, indicativo de sub-expressão desta proteína. .... 95





## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1.</b> Principais objectivos e metas propostas pela OMS, para o controlo global da malária, definidos para o período compreendido entre 2016–2030. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde. ....	12
<b>Tabela 2.1.</b> Descrição das amostras utilizadas ao longo deste projecto, contendo informação acerca do tipo de amostra, presença ou ausência de infecção, e outras informações relevantes para cada tipo de amostra estudada. ....	41
<b>Tabela 2.2.</b> Designação das amostras de plasma humano, cedidas pelo IHMT. Estão também apresentados os dados relativos ao estado clínico de cada dador aquando da colheita da amostra. Estão também apresentadas informações referentes ao historial clínico de malária de cada indivíduo. ....	45
<b>Tabela 2.3.</b> Programa de focagem isoelectrica utilizado, com o auxílio do sistema <i>Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing System</i> (GE Healthcare). ....	55
<b>Tabela 3.1.</b> Valores de quantidade de proteína, apresentados em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , das amostras de sobrenadantes de culturas de eritrócitos, cedidas pelo IMM e IHMT, após a utilização de Amicons Ultra-0,5 50K e o <i>kit AlbuminOut</i> . As amostras foram posteriormente concentradas, com Amicons Ultra-0,4 3K, numa razão de cerca de 1:15. ....	70
<b>Tabela 3.2.</b> Valores de quantidade de proteína, apresentados em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , das amostras de soro humanos, cedidas pelo IHMT, após a utilização de vários tratamentos para a otimização das quantidades relativas de proteínas das amostras. ....	74
<b>Tabela 3.3.</b> Valores de quantidade de proteína, apresentados em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , das amostras de soro humanos, cedidas pelo IHMT, seleccionadas para a etapa de electroforese bidimensional. Os valores iniciais e finais de quantidade de proteína são referentes ao conteúdo proteico das amostras, antes e depois da realização do <i>2D Clean Up Kit</i> , da GE Healthcare. ....	77
<b>Tabela 3.4.</b> Proteínas identificadas, correspondentes a <i>spots</i> proteicos nos géis obtidos através de electroforese bidimensional, com identificação do organismo, da massa molecular (MM) e variação da quantidade de volume de cada spot, relativamente à amostra controlo. Valores inferiores a 0,7 foram considerados sub-expressão e valores superiores a 1,5 referem-se a sobre-expressão. ....	82



## Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

°C – Graus Celsius

**2-DE** – Electroforese Bidimensional (do inglês *2-Dimensional Electrophoresis*)

**ACT** - *Artemisinin-based Combination Therapy*

**AMFm** – *Affordable Medicine Facility-malaria*

**AO** – Laranja de Acridina, do inglês *Acridine Orange*

**AO** – Laranja de Acridina, do inglês *Acridine Orange*

**APOA1** – *Apolipoprotein A-I*

**BCP** – Benzotiocarboxilpurina, do inglês *Benzothiocarboxypurine*

**C3** – Complemento C3

**C4A** – Complemento C4-A

**CHAPS** - *3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate*

**DTT** – Ditioneitol

**ELISA** – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

**FRP** – Fazer Recuar o Paludismo

**FT-ICR** - *Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance*

**GPI** – Glicofosfatidilinositol

**HBB** – *Hemoglobin subunit beta*

**HP** – *Haptoglobin*

**IEF** – Focagem Isoelétrica, do inglês *Isoelectric Focusing*

**IFAT** – *Immunofluorescence Antibody Test*

**IGKC** – *Immunoglobulin Kappa Chain C Region*

**IHMT** – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**IMM** – Instituto de Medicina Molecular

**IPG** – Gradiente de pH imobilizado, do inglês *Immobilized pH Gradient*

**IPTi** - *Intermittent Preventive Treatment in Infants*

**IPTp** - *Intermittent Preventive Treatment in Pregnancy*

**kDa** – quilodalton

**LDH** – Lactato Desidrogenase (do inglês *Lactate Dehydrogenase*)

**m/z** – razão massa / carga

**MALDI** – *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*

**mL** - mililitro

**mM** - milimolar

**MS** – Espectrometria de massa (do inglês *Mass Spectrometry*)

**MS/MS** – *Tandem Mass Spectrometry*

**MTI** – Redes Mosquiteiras tratadas com Insecticida

**ODM** – Objectivos de Desenvolvimento do Milénio

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**ORM1** – *Alpha-1-acid glycoprotein 1*

**PBS** – Tampão Fosfato-salino, do inglês *Phosphate-Buffered Saline*

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction*

**PDB** – *Protein Data Bank*

**Pf** – *Plasmodium falciparum*

**PfHRPII** – Proteína Rica em Histidina II (do inglês *Histidine Rich Protein II*) de *Plasmodium falciparum*

**PfHsp70** – Proteína de Choque Térmico 70 (do inglês *Heat Shock Protein 70*) de *Plasmodium falciparum*

**pI** – Ponto Isoelétrico

**PMF** – *Peptide Mass Fingerprint*

**PMSF** - *Phenylmethylsulfonyl fluoride*

**ppm** – partes por milhão

**PRR4** – *Proline-rich Protein 4*

**RBMI** - *Roll Black Malaria Initiative*

**RBP4** – *Retinol-binding Protein 4*

**RDT** - Teste de Diagnóstico Rápido (do inglês *Rapid Diagnostic Test*)

**rpm** – Rotações por minuto

**SDS** – Dodecil-Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium-Dodecil Sulfate*)

**SDS-PAGE** – *Sodium-Dodecil Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

**SP** - Sulfadoxina-Pirimetamina

**TOF** – *Time Of Flight*

**TTR** - *Transthyretin*

**UNRIC** - *United Nations Regional Information Centre*

**USD** – *United States Dollar*

**V** – volt

**µg** - micrograma

**µL** – microlitro

**µM** - micromolar



# **1.Introdução**





## 1.1. Malária

### 1.1.1. A Doença

A Malária, ou paludismo, é uma doença infecciosa causada por um parasita do género *Plasmodium*, da família *Plasmodiidae* e filo *Apicomplexa*, que infeta dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado (Aly *et al*, 2009; Morrison, 2009)

Existem mais de 200 espécies de parasitas pertencentes ao género *Plasmodium*, mas apenas cinco destas causam a doença da malária em seres humanos. Estas cinco espécies são: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. knowleri* e *P. malariae* (Perkins *et al*, 2009; Chavatte *et al*, 2007). As cinco espécies diferem entre si em vários aspetos: morfológicos, imunológicos, a sua distribuição geográfica, padrões de ocorrência de infeção e transmissão, e também na resposta aos fármacos antimaláricos (Honey, 2009; Perkins *et al*, 2009; Tuteja, 2007).

A malária é transmitida ao ser humano através da picada do mosquito fêmea da espécie *Anopheles spp.* Existem aproximadamente 400 espécies de *Anopheles spp.* em todo o mundo, das quais cerca de 60 são vetores de malária, sendo que 30 delas são consideradas de maior importância (Tuteja, 2007). Apenas este género de mosquitos é capaz de transmitir malária.

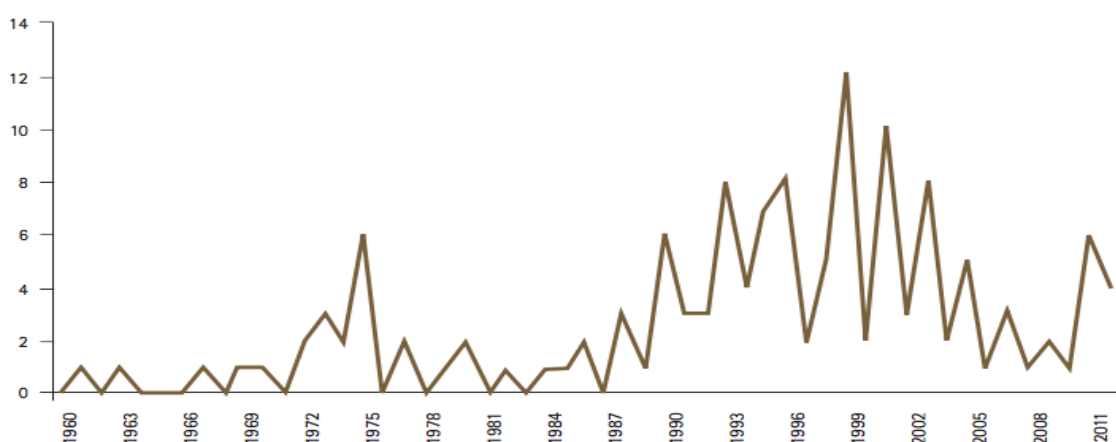
A malária é transmitida apenas através da picada do mosquito, ou através de transfusões sanguíneas, não sendo considerada uma doença sexualmente transmissível (*Centers for Disease Control and Prevention – Malaria*, Setembro 2015).

A forma mais severa de malária em seres humanos é causada pela espécie *P. falciparum*, e é a principal causa de mortalidade em crianças com idade inferior a 5 anos, especialmente na região da África Subsariana. A infeção de malária menos comum é causada por *P. ovale*, que existe quase unicamente na região oeste de África. *P. malariae* é encontrada em todo o mundo, mas as suas infeções têm baixa frequência. O parasita da malária mais comum, a uma escala global, é o *Plasmodium vivax*, mas as infeções por este causadas raramente são letais (Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde, Agosto 2016). *P. falciparum* é a espécie mais comum em África.

Apesar de esta doença ter sido erradicada da Europa nos anos setenta, a malária importada, ou seja, contraída por indivíduos que habitam em regiões onde não existe transmissão de malária, em regiões onde a transmissão de malária se encontra ativa, é um problema crescente em muitos países ocidentais. O número de casos deve-se não só ao número cada vez maior de visitantes de regiões onde a transmissão da doença se encontra ativa, devido principalmente ao turismo em zonas onde esta doença é considerada endémica, mas também devido ao crescimento da população de imigrantes provenientes desses países.

Em Portugal, o último caso de malária indígena, ou seja, contraída no país, foi registado em 1958 e, no período compreendido entre 1990-2008, foram diagnosticados 1 329 casos declarados de malária importada, o que representa um valor médio de 68 casos por ano. No período compreendido entre os anos 1960-2012, foram registados em Portugal 138 óbitos causados por infeção de malária importada, o que corresponde a uma média de 2,6 falecimentos por ano. (Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas, Maio-Agosto 2014). Estes dados podem ser consultados na Figura 1.1, distribuídos pelo número de óbitos em Portugal no período acima referido, por ano.

**Mortalidade em Portugal, por malária importada, por anos (1960-2012)**



**Figura 1.1.** Representação gráfica dos dados referentes à mortalidade por malária importada, em Portugal Continental, no período compreendido entre 1960-2012. Adaptado de Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas, Maio-Agosto 2014.

### 1.1.2. Incidência e Distribuição Geográfica

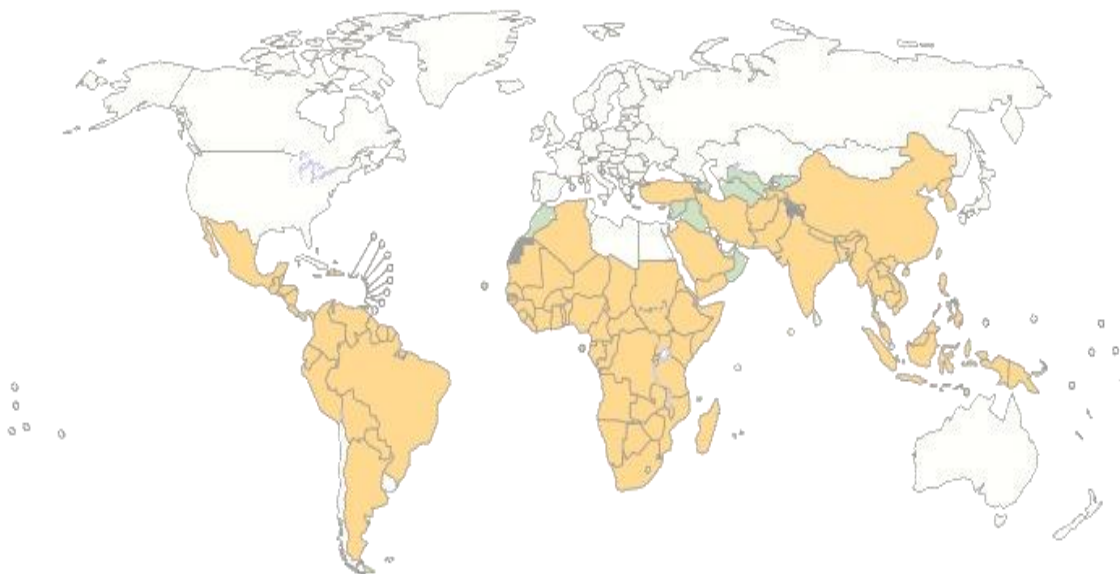
A malária encontra-se distribuída maioritariamente em regiões centradas em torno da linha equatorial, nomeadamente em grande parte da África Subsariana, Ásia e na América Central e de Sul (Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde, Agosto 2016).

Estas áreas de risco situam-se principalmente em regiões com climas tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas, caracterizadas por elevadas temperaturas e elevados níveis de humidade, assim como a existência de águas paradas, proporcionam condições adequadas para a proliferação do vetor do mosquito *Anopheles spp.*

Desde 2000, o financiamento e a cobertura de programas de luta contra a malária aumentaram consideravelmente, resultando na redução, em larga escala, da incidência da

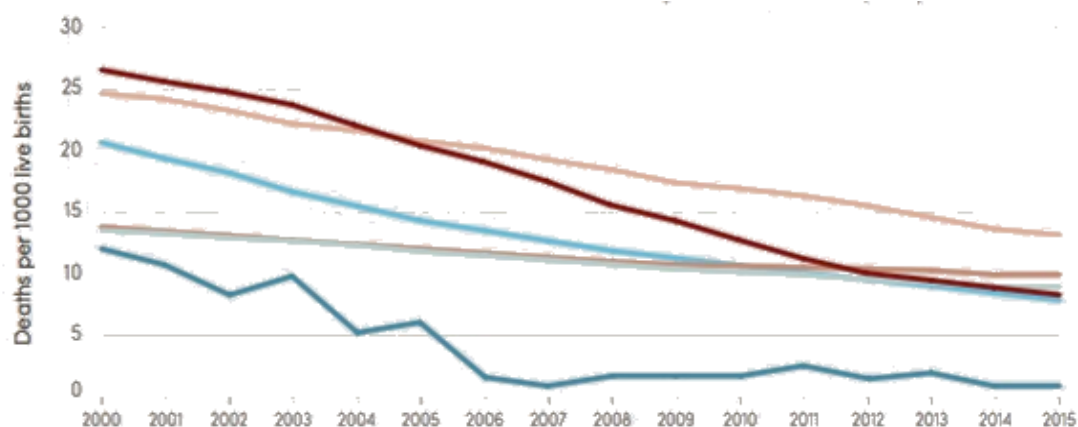
doença e das respetivas taxas de mortalidade (Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde, Agosto 2016).

De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, do inglês *World Health Organization* (WHO)), relativos ao período compreendido entre 2000 e 2015, registou-se uma redução de incidência da malária, passando de 106 para 95 o número de países, onde a transmissão da doença ainda se encontra ativa. Os dados referentes ao número de países com e sem transmissão ativa de malária, no período de 2000-2015, podem ser consultados na Figura 1.2.



**Figura 1.2.** Representação dos países com transmissão ativa de malária, no período compreendido entre 2000-2015. A laranja estão representados os países nos quais a malária é considerada endémica. A verde estão representados os países em que no ano de 2000, a malária era considerada endémica, mas que em 2015 já não o são. A branco estão representados os países em que não existe transmissão ativa de malária, nem esta doença é considerada endémica. A cinzento estão representados os países para os quais os dados obtidos não são aplicáveis. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde.

O número de mortes provocado pela doença da malária apresentou um decréscimo de cerca de 48% nas regiões africanas onde a OMS atua, tendo-se registado a diminuição de 839 mil para 438 mil mortes. Em crianças com idades inferiores a 5 anos, cuja faixa etária é a de maior incidência da doença, o número de mortes foi reduzido de 723 mil para 306 mil, no período compreendido entre 2000 e 2015 (Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde, Agosto 2016). As principais causas de mortalidade de crianças com idades inferiores a 5 anos, na região da África Subsaariana, entre o período de 2000-2015, podem ser consultados na Figura 1.3.



**Figura 1.3.** Representação gráfica das principais causas de morte de crianças com idade inferior a 5 anos, na região da África Subsaariana, no período compreendido entre 2000-2015. Os dados representados refletem o número de mortes por cada 1000 nascimentos. A vermelho estão representados os óbitos causados por malária. A azul claro os óbitos causados por asfixia ou trauma aquando o nascimento. A azul estão representados os óbitos devidos a doenças relacionadas com diarreia. A azul escuro estão representados os óbitos causados por a doença de sarampo. A laranja estão representados os óbitos que ocorreram prematuramente. A amarelo estão representados os óbitos causados por infecções respiratórias agudas. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde.

Segundo os dados do Relatório Anual de Malária de 2015 da OMS, desde 2000, 57 países reduziram em 75% os casos de malária face aos objetivos traçados para 2015, encontrando-se no bom caminho de atingir a meta de reversão da incidência, fixada nos Objetivos de Desenvolvimento do Milénio (ODM) (*United Nations Regional Information Centre (UNRIC)*) pela Assembleia Mundial de Saúde (Organização Mundial de Saúde (OMS)) e pelo programa Fazer Recuar o Paludismo (FRP).

No entanto, estima-se que a nível global cerca de 3,4 mil milhões de pessoas encontram-se em risco de contrair a doença da malária (Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde, Agosto 2016).

Assim sendo, esta doença constitui um problema bastante grave, não só a nível social, mas também a nível económico, sendo por isso de extrema importância o controlo e erradicação da malária.

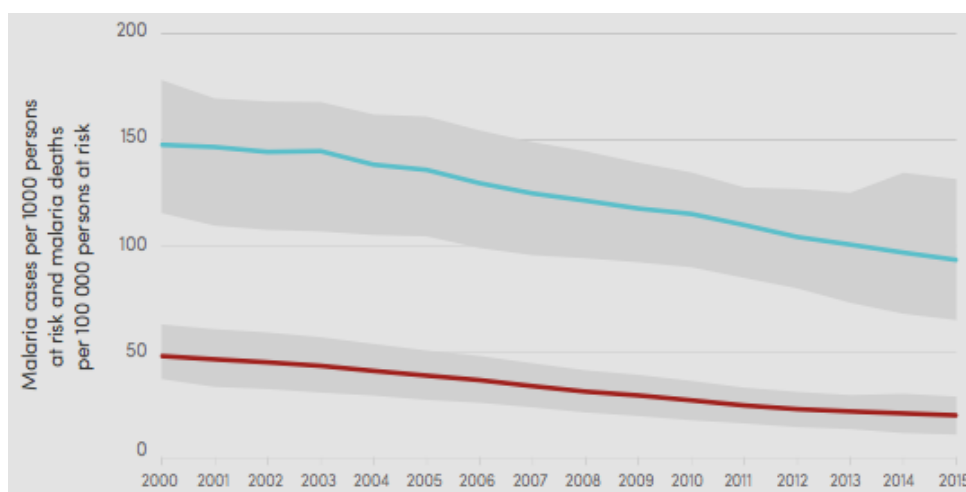
### 1.1.3. Medidas de Controlo

A malária é uma doença que pode ser fatal, mas para a qual existe tratamento, sendo por isso de extrema importância uma identificação correta e inequívoca o mais precocemente possível, o que nem sempre acontece. A ineficiência no diagnóstico precoce e correto da infeção de malária está muitas vezes relacionada com o facto de os sintomas iniciais desta

doença serem pouco específicos, podendo ser facilmente confundidos com os sintomas de uma gripe. Apesar de todos os métodos que existem atualmente para o diagnóstico desta doença, os métodos mais sensíveis e exatos não estão muitas vezes ao alcance destas populações, devido ao custo e à necessidade de intervenção de profissionais especializados, e também ao facto de na África Subsariana, maior região onde a malária é ainda hoje considerada endémica, prevalecer a escassez de meios e bens, e a instabilidade política e social, fatores que condicionam a sua implementação. Métodos designados como testes rápidos (RDTs, do inglês *Rapid Diagnostic Tests*), não permitem atualmente a exatidão, precisão e sensibilidade necessárias para o diagnóstico inequívoco de malária.

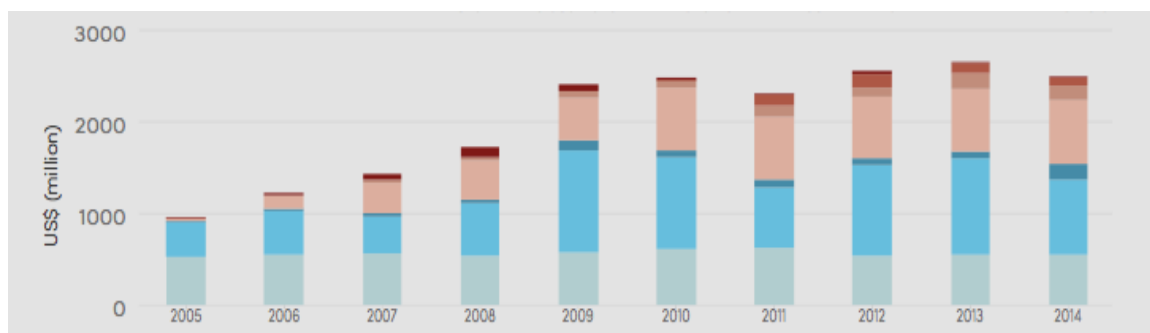
Existem várias iniciativas internacionais que têm como objetivo o combate à malária, das quais se destacam a *Roll Back Malaria Initiative* (RBMI), a *Affordable Medicine Facility-Malaria* (AMFm), a *Multilateral Initiative in Malaria*, a *Medicines for Malaria Venture*, a *Malaria Vaccine Initiative*, o *Global Funds to Fight AIDS* ou a *TB and Malaria*, que suportam a implementação de programas de prevenção e tratamento, para tentar erradicar esta doença.

De acordo com o Relatório Anual de Malária de 2015, da OMS, estima-se que estes programas, em conjunto com todos os outros programas que existem globalmente, tenham evitado mais de 650 mil casos de malária entre 2001 e 2015. Os dados relativos às estimativas da redução da taxa de incidência de malária, assim como a sua taxa de mortalidade, globalmente, e no período de 2000-2015, podem ser consultados na Figura 1.4.



**Figura 1.4.** Representação gráfica da redução global do índice de mortalidade da malária, globalmente, no período compreendido entre 2000-2015. Os dados apresentados são referentes à taxa de incidência e índice de mortalidade de malária, sendo os valores apresentados correspondentes ao número de casos de malária por cada 1000 pessoas em risco de contrair a infeção, e ao número de mortes causadas por malária, por cada 100 000 habitantes, respetivamente. A azul está representada a incidência de malária, que no período acima referido, sofreu um decréscimo de 37%. A vermelho está representado o índice de mortalidade causado pela doença, que no mesmo período de 15 anos sofreu um decréscimo de 60%. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde.

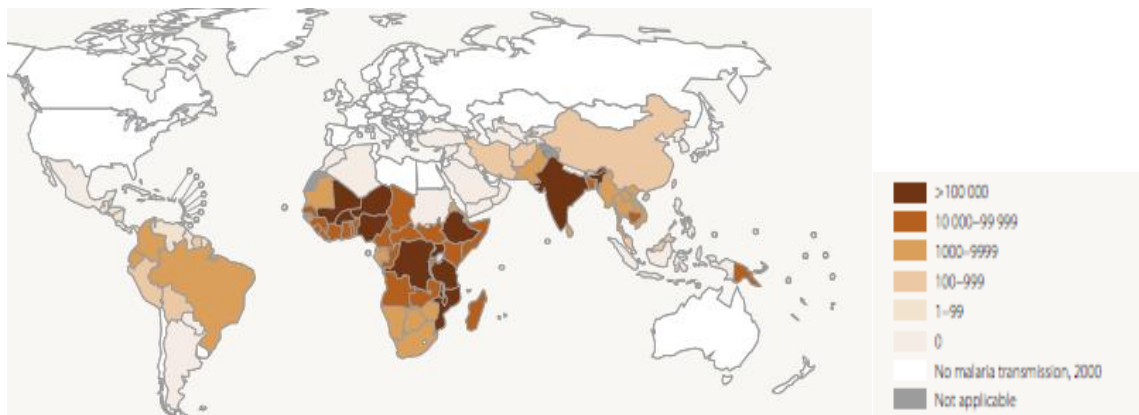
O financiamento global de programas de luta contra a malária aumentou para 2,5 bilhões de dólares americanos (USD, do inglês *United States Dollar*) em 2014, face ao valor estimado, em 2005, de 960 milhões (USD). Apesar desta tendência crescente no apoio financeiro a programas de controlo desta infeção, os fundos internacionais para a ajuda a estes programas sofreram um decréscimo de 8%, no período de 2013-2014. Os valores relativos aos fundos cedidos pelos principais financiadores de programas de controlo de malária, no período de 2005-2014, encontram-se na Figura 1.5.



**Figura 1.5.** Valores de investimentos em ações para o controlo da doença da malária, obtidos através de fontes de financiamento, no período compreendido entre 2005-2014. Os valores apresentados são relativos a milhões de dólares (USD). Estão representados as seguintes fontes de financiamento: Programas nacionais de controlo de malária (verde), *Global Fund to Fight AIDS, TB and Malaria* (azul claro), o Banco Mundial (azul escuro), os Estados Unidos da América (amarelo), o Reino Unido (laranja), o *Affordable Medicine Facility-Malaria* (AMFm) (vermelho) e outros financiadores, a castanho. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde.

Embora os progressos no controlo da incidência de malária sejam notáveis, esta doença continua a constituir um grave problema de saúde pública em todo o mundo. A redução da incidência e da taxa de mortalidade provocadas por malária acontece a um ritmo muito lento nos países que, no ano de 2000, registavam os valores mais elevados de casos de malária e mortes associadas, dados que evidenciam a urgência de acelerar a redução da incidência desta doença, visando a redução da sua taxa de mortalidade associada (Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde, Agosto 2016).

Os principais objetivos dos programas de controlo de malária são a redução da incidência, transmissão e a mortalidade que lhe está associada. Para o seu cumprimento foram definidos alguns objetivos fundamentais, como o diagnóstico precoce e tratamento imediato e adequado dos casos de doença, especialmente os casos definidos como graves, e também o controlo seletivo dos vetores, que compreende o controlo adequado do ambiente, passando principalmente pelo tratamento químico de domicílios e de espaços abertos (Ações de Controlo da Malária, 2005). Na Figura 1.6 podemos observar as estimativas do número de mortes associadas à doença da malária de malária que foram evitados, no período entre 2000-2013.



**Figura 1.6.** Representação das estimativas, da OMS, do número de mortes causadas por malária, que foram evitados através de ações de controlo da doença, num período compreendido entre 2001-2013. A legenda da figura encontra-se indicada, e os valores correspondem ao número de mortes evitadas estimado. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2014, Organização Mundial de Saúde.

A combinação de tratamento com fármacos anti-maláricos adequados com o controlo eficiente do vetor de transmissão, é também fundamental para a redução da transmissão e controlo da doença da malária.

Atualmente, deparamo-nos com dois tipos de problemas a ter em conta no controlo da infeção de malária: em países que os casos de malária são raros, os sintomas da doença são associados a gripes ou outras infeções comuns, afastando, erraticamente, as hipóteses do diagnóstico precoce das infeções, e em países em que a malária é uma doença comum, é habitual a assunção de diagnósticos precipitados, sendo por vezes administrados agentes químicos anti-maláricos para a sua prevenção, e tratamento, de forma indiscriminada (Rosenthal, 2012).

A administração indiscriminada de fármacos anti-maláricos, como cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina (SP), levou a que o parasita *Plasmodium* desenvolvesse resistência aos mesmos, tornando-se atualmente no maior obstáculo ao combate à doença (Rosenthal, 2012; Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde, Agosto 2016). Para um controlo eficaz da malária é recomendada a implementação de várias medidas, tais como a utilização de redes mosquiteiras tratadas com insecticida (MTI), e de *sprays* inseticidas residuais.

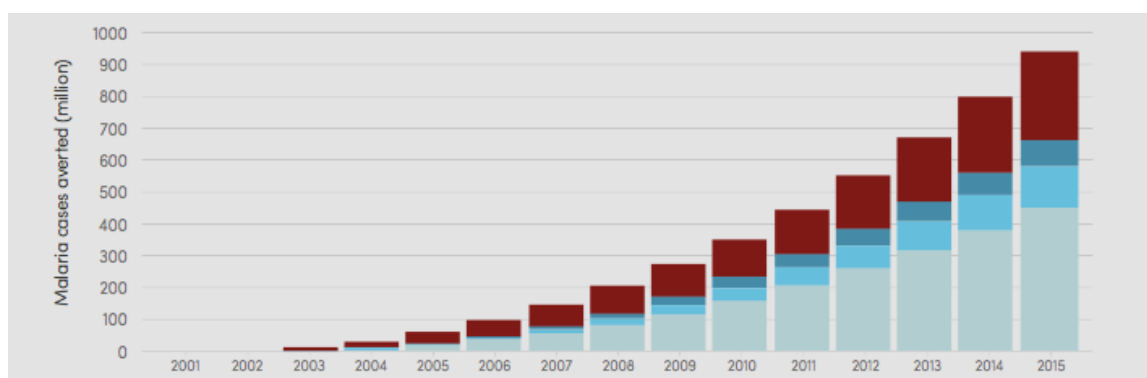
A quimioprevenção, adequada para as populações consideradas mais vulneráveis, particularmente mulheres grávidas e recém-nascidos é crucial, tendo a OMS recomendado a implementação de programas de tratamento preventivo intermitente na gravidez (IPTp, do

inglês *Intermittent Preventive Treatment in Pregnancy*), com uma aplicação recomendada de 3 doses. Foram também implementados os programas de quimioprevenção sazonal em crianças (IPTi, do inglês *Intermittent Preventive Treatment in Infants*) (Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde, Agosto 2016).

De igual modo, foi recomendada a confirmação do diagnóstico de malária através de microscopia ótica ou outros métodos de diagnóstico, incluindo os testes de diagnóstico rápido (RDTs), para casos de suspeita de infeção.

O tratamento atempado com fármacos antimaláricos adequados, como as terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs, do inglês *Artemisinin-based Combination Therapies*), é atualmente o método mais eficaz para o tratamento de infeções causadas por *P. falciparum* (Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde, Agosto 2016).

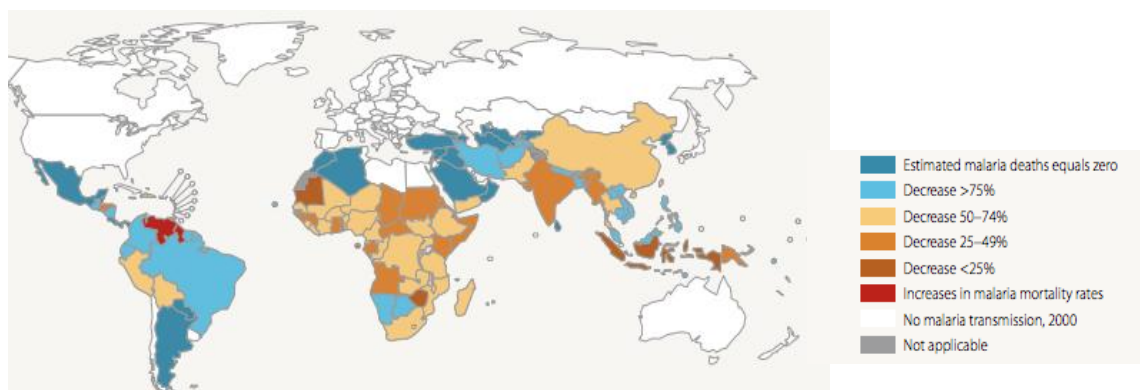
Com este tipo de intervenções, ao longo dos últimos anos, foi possível reduzir significativamente as taxas de mortalidade por malária, bem como a incidência desta doença. A OMS estima que, no período compreendido entre 2001-2015, tenham sido evitados 1,2 biliões de casos de malária, e 6,2 milhões de mortes causadas por esta infeção, globalmente (Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde, Agosto 2016). O número cumulativo de casos de malária evitados por intervenções de controlo da doença, como a utilização de redes mosquiteiras tratadas com inseticida, *sprays* residuais de inseticida e terapias combinadas, baseadas em artemisinina, na região da África Subariana, e relativos ao período compreendido entre 2000-2015, podem ser consultados na Figura 1.7.



**Figura 1.7.** Representação gráfica do número estimado, e acumulado, de casos de malária que foram evitados através de intervenções para o controlo da doença. Os valores apresentados são de milhões de casos evitados. A azul claro, aparecem os casos evitados através de redes mosquiteiras tratadas com inseticida. A azul estão indicados os casos evitados através da utilização de terapias combinadas à base de artemisinina. A azul escuro estão representados os casos evitados através de *sprays* residuais de inseticida. A vermelho aparecem representados a totalidade dos casos evitados, através do três métodos acima referidos. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde.



A OMS estima que a taxa de incidência tenha sido reduzida em cerca de 30%, a nível mundial, entre 2000 e 2013, enquanto as taxas estimadas de mortalidade tenham sofrido uma redução de 47%, em igual período. As alterações na taxa de mortalidade causada por malária, por país, no período de 2000-2013, podem ser consultadas na Figura 1.8.



**Figura 1.8.** Representação das estimativas, da OMS, da variação, em percentagem, da taxa de mortalidade causada por malária, no período compreendido entre 2000-2013. A legenda da figura encontra-se indicada, sendo os valores atribuídos de acordo com a variação apresentada. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2014, Organização Mundial de Saúde.

De referir que nem todos os casos e óbitos evitados podem ser atribuídos às intervenções contra a malária, podendo alguns destes progressos estar relacionados com o aumento da taxa de urbanização e o desenvolvimento económico global, que contribuem para melhorar as condições de habitação, higiene e nutrição.

Ainda que estejam a ser alcançadas as metas traçadas, é necessário manter e reforçar os esforços de controlo da malária, para garantir que populações mais vulneráveis possam ter acesso a intervenções que possam evitar mortes causadas por esta doença, pois apesar de todos os esforços globalmente realizados, ainda falta um longo caminho a percorrer até à erradicação da malária.

A estratégia de controlo e luta contra a malária, traçada pela OMS, para o período entre 2016 e 2030, aprovada pela Assembleia Mundial de Saúde em Maio de 2015, apresenta-se ambiciosa, traçando como objetivo final a redução mínima em 90% da incidência e mortalidade global da malária. Esta estratégia encontra-se resumida na tabela 1.1.

**Tabela 1.1.** Principais objetivos e metas propostas pela OMS, para o controlo global da malária, definidos para o período compreendido entre 2016–2030. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde.

Objetivos	Metas Propostas		
	2020	2025	2030
Redução de taxas globais de mortalidade comparativamente a 2015	Mínimo de 40%	Mínimo de 75%	Mínimo de 90%
Redução de incidência de casos comparativamente a 2015	Mínimo de 40%	Mínimo de 75%	Mínimo de 90%
Eliminação de malária em países nos quais se registou transmissão em 2015	Mínimo de 10 países	Mínimo de 20 países	Mínimo de 35 países
Prevenção do restabelecimento de malária em países onde a malária foi erradicada	Restabelecimento prevenido		

## 1.2. *Plasmodium falciparum*

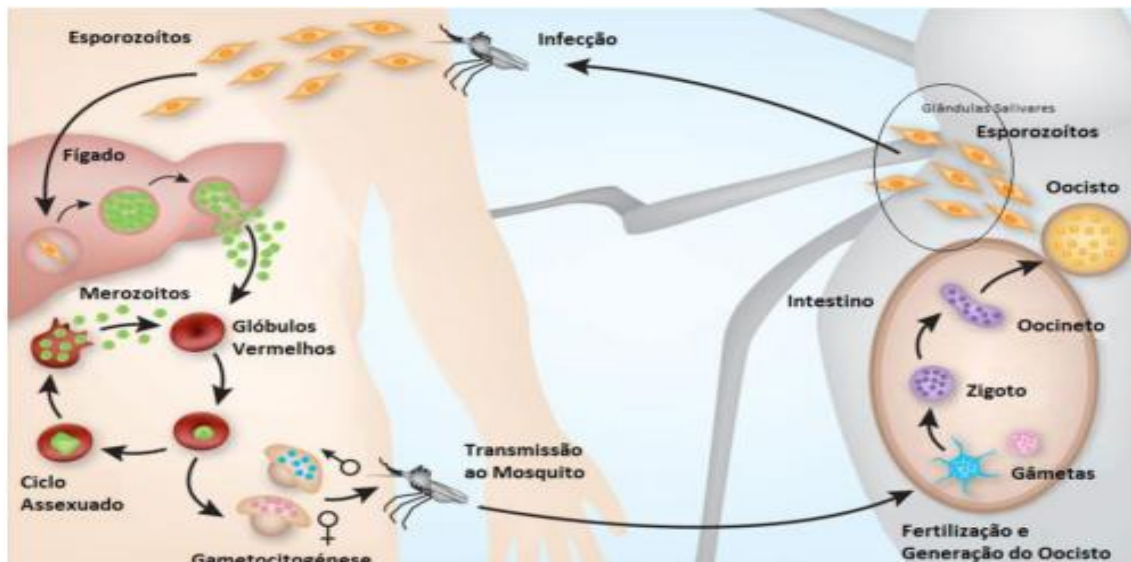
### 1.2.1. Ciclo de Vida

A ecologia natural que envolve os parasitas de malária, do género *Plasmodium*, é caracterizada pela infeção sucessiva de dois tipos de hospedeiros: seres humanos, ou outros animais vertebrados, e o mosquito fêmea da espécie *Anopheles spp.* A infeção de malária, em seres humanos, pode ser provocada por cinco espécies do parasita *Plasmodium*, sendo elas *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e a *P. knowleri*, sendo as espécies *P. falciparum* e *P. vivax* as duas mais comuns.

O ciclo de vida de *Plasmodium spp.*, é bastante complexo, e pode ser dividido em duas etapas distintas de reprodução, diferindo entre si em vários aspetos a nível fenotípico.

- Uma primeira etapa, que corresponde a uma fase de reprodução sexuada, que ocorre no mosquito fêmea, da espécie *Anopheles spp.*

- Uma segunda etapa, em que ocorre uma fase de reprodução assexuada, que ocorre em animais vertebrados, como seres humanos ou outros mamíferos.



**Figura 1.9.** Representação esquemática do ciclo de vida do parasita do gênero *Plasmodium* spp.. Estão também representadas as diversas etapas das duas fases de reprodução do ciclo de vida deste organismo: a fase de reprodução assexuada, que ocorre em animais vertebrados, como o ser humano, e a fase de reprodução sexuada, que ocorre no mosquito fêmea da espécie *Anopheles* spp.. Adaptado de Pasvol, 2010.

O ciclo de vida de parasitas de gênero *Plasmodium* foi definido com uma fase de reprodução sexuada seguida por três fases de multiplicação assexuada.

Nos seres humanos, o ciclo de vida de *Plasmodium* tem início com a picada de um mosquito fêmea *Anopheles*, que foi previamente infetado. Os parasitas saem das glândulas salivares do mosquito, sob a forma de esporozoítos, que sendo inoculados na derme, passam para a corrente sanguínea do indivíduo infetado (Amino *et al*, 2006; Stefan *et al*, 2004; Tuteja, 2007; Yamauchi *et al*, 2007). Estes seguem depois em direção às células do fígado, denominados hepatócitos, num processo que demora, normalmente, entre 2 a 30 minutos. Nos hepatócitos, os esporozoítos de *Plasmodium* entram na fase de reprodução assexuada, diferenciando-se posteriormente em trofozoítos hepáticos, e levando à formação de centenas de merozoítos, que estão assim prontos para infetarem os eritrócitos do hospedeiro aquando da rutura das células hepáticas e da sua posterior libertação na corrente sanguínea.

O desenvolvimento nos hepatócitos, para a espécie *P. falciparum*, requer cerca de uma semana.

Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos alcançam e invadem os eritrócitos, iniciando rapidamente o processo de reprodução assexuada. Já no interior dos eritrócitos, os merozoítos amadurecem para trofozoítos e esquizontes, causando a rutura da célula e libertando para o sangue uma nova geração de merozoítos, que se encontram preparados para invadir novos eritrócitos. Este processo de invasão é denominado por fase exo-eritrocítica. Estes merozoítos irão, posteriormente, infetar outros eritrócitos, num processo denominado por

fase eritrocítica (Prudêncio *et al*, 2006; Prudêncio *et al*, 2008). É nesta fase que os sintomas de malária se começam a manifestar (Aly *et al*, 2009; Pasvol, 2010; Prudêncio *et al*, 2006). Estes sintomas iniciais incluem febres altas, dor de cabeça, dores musculares, vômitos e náuseas, sendo por isso comum a sua confusão com os sintomas comuns de uma gripe (Prudêncio *et al*, 2006; Sturm *et al*, 2006), o que dificulta o seu diagnóstico (Bartolini *et al*, 2012). Estes sintomas iniciam-se logo após o período de incubação, que normalmente é de cerca de 7 a 30 dias (Trampuz *et al*, 2003; *Centers for Disease Control and Prevention – Malaria*, Setembro 2015).

Enquanto alguns merozoítos invadem outras células, outros entram num processo denominado gametocitogénese, levando à formação de gâmetas, que ainda não se encontram maduros, sendo então denominados gametócitos. Quando um mosquito pica um hospedeiro já infetado, estes gametócitos são imediatamente absorvidos pelo parasita, posteriormente amadurecendo no seu intestino. Os gâmetas femininos e masculinos fertilizam, numa fase de reprodução sexuada, formando os zigotos, que se irão diferenciar, originando oocistos.

Estes, por sua vez, desenvolvem-se em esporozoítos e, uma vez que rebentam o oocisto, migrando para as glândulas salivares do mosquito, ficando assim prontos para serem injetados na corrente sanguínea do próximo hospedeiro (Jones *et al*, 2006; Pasvol, 2010; Prudêncio *et al*, 2006), estando prontos para um novo ciclo.

Assim sendo, o ciclo repete-se sucessivamente, sendo responsável pela patogenia da doença. As febres cíclicas são características da infeção da malária, e ocorrem tipicamente quando se dá a lise dos eritrócitos, com a libertação de parasitas na forma de merozoítos. Na infeção de malária causada por *P. falciparum*, estes ciclos ocorrem normalmente com uma periodicidade de 48 horas.

### **1.2.2. Proteoma de *Plasmodium***

O proteoma de uma determinada espécie é o conjunto das proteínas que o constituem num determinado momento. A proteómica é o estudo das proteínas presentes num determinado momento num organismo, em termos da sua expressão, localização, interação e modificações pós-transcricionais, permitindo uma perspetiva global e integrada de aspetos biológicos, através do estudo do conjunto de proteínas que deles são parte integrante (Graves *et al*, 2002).

Os estudos de proteómica podem ser realizados para identificação de proteínas, assim como para identificação de diferentes perfis de expressão de proteínas, modificações e regulação pós-transcricionais, mecanismos de *splicing* alternativo, localização subcelular e, principalmente, a interconectividade entre todos estes diferentes processos (Graves *et al*, 2002; Oliveira *et al*, 2014), sendo por isso uma boa ferramenta para o estudo de interações entre

hospedeiro-parasita. A identificação e compreensão das proteínas expressas, assim como os seus níveis de expressão, durante o ciclo de vida do parasita, podem ajudar na identificação de novos alvos para diagnóstico, fármacos de tratamento, ou mesmo vacinas anti-maláricas, tendo em conta que o proteoma de um determinado organismo pode ser considerado dinâmico, dado que este reflete o ambiente em que este é estudado (Graves *et al*, 2002). Estes processos podem ajudar no desenvolvimento de novas e melhores estratégias para o controlo e erradicação desta doença. O desenvolvimento de métodos de diagnóstico e tratamento, tendo como alvo uma determinada fase do ciclo de vida de *Plasmodium*, requer a identificação das proteínas expressas em cada fase (Hoffman *et al*, 2000).

Têm sido realizados vários estudos na análise do proteoma de *Plasmodium*, como a identificação de novas proteínas ancoradas a moléculas de glicofosfatidilinositol (GPI, do inglês *glycophosphatidylinositol*), e das proteínas que com estas interagem, através da análise de proteomas compartimentalizados em membranas do parasita de malária (Sanders *et al*, 2005), estudos de membranas de eritrócitos infetados e da fenda de Mauer em parasitas maduros (Florens *et al*, 2005; Vincensini *et al*, 2005). Estudos similares foram realizados em diferentes estádios do ciclo de vida do parasita, em vários organelos, como por exemplo no vacúolo do parasita (Nyalwidhe *et al*, 2004), ou com proteínas específicas do oócito ou gametócito (Khan *et al*, 2005). Estes estudos destacaram a peculiaridade de proteomas específicos para as diferentes fases e estratégias do ciclo de vida de *Plasmodium*, assim como proteomas especializados dos diferentes compartimentos subcelulares, sendo considerados como potenciais alvos para fármacos específicos para o parasita.

O género *Plasmodium* é constituído por mais de 5000 proteínas (Birkholtz *et al*, 2008), das quais apenas uma pequena fração foi caracterizada. Das cerca de 2500 proteínas do proteoma do parasita que foram identificadas, cerca de 124 foram identificadas nos quatro estádios do ciclo de vida, sendo estes esporozoítos, merozoítos, trofozoítos e gametócitos (Florens *et al*, 2002). Estas proteínas conservadas são maioritariamente proteínas ‘housekeeping’, incluindo proteínas ribossómicas e do citosqueleto, factores de transcrição e histonas.

Com a sequenciação completa do genoma de diferentes espécies de *Plasmodium* e dos seus hospedeiros, houve um grande aumento do contributo da análise proteómica em diferentes áreas de investigação desta doença, como a compreensão das interações entre parasita-hospedeiro, a patogénese da doença e resposta imune do hospedeiro, a caracterização do proteoma global e específico de cada fase do ciclo de vida do parasita, a análise do secretoma ou a elucidação dos mecanismos de ação de fármacos anti-maláricos. Os fatores específicos do parasita e hospedeiro que atribuem à malária de *P. falciparum* a sua complexidade ainda não foram porém, atualmente, compreendidos.

Assim sendo, não existe nenhum mecanismo pelo qual possamos compreender, ou até antecipar, a infeção de malária nos seus estádios iniciais.

Os estudos do proteoma de *Plasmodium* são assim de extrema importância para a caracterização do proteoma deste organismo, podendo conduzir não só à compreensão da patogénese de malária, como também à identificação de potenciais biomarcadores que permitam a obtenção de um diagnóstico credível, o mais precocemente possível, e para monitorização das infeções, podendo assim constituir um contributo essencial para o controlo e erradicação desta infeção.

Deste modo, este projeto teve como objetivo principal a identificação de possíveis biomarcadores da doença de malária, ou seja, de proteínas expressas por *P. falciparum*, que estejam presentes na corrente sanguínea do ser humano infetado, e que possam ser indicadoras da infeção de malária. São também importantes proteínas expressas pelo organismo infetado, o ser humano, mas que em condições de infeção por *P. falciparum* apresentem níveis de expressão significativamente diferentes. Esta análise e identificação foi conduzida em amostras de sobrenadantes de culturas não infetadas e infetadas pelo parasita, assim como em amostras de soros humanos, provenientes de um indivíduo saudável, de um indivíduo saudável, que apresentava historial clínico de malária, e de um indivíduo infetado com malária aguda.

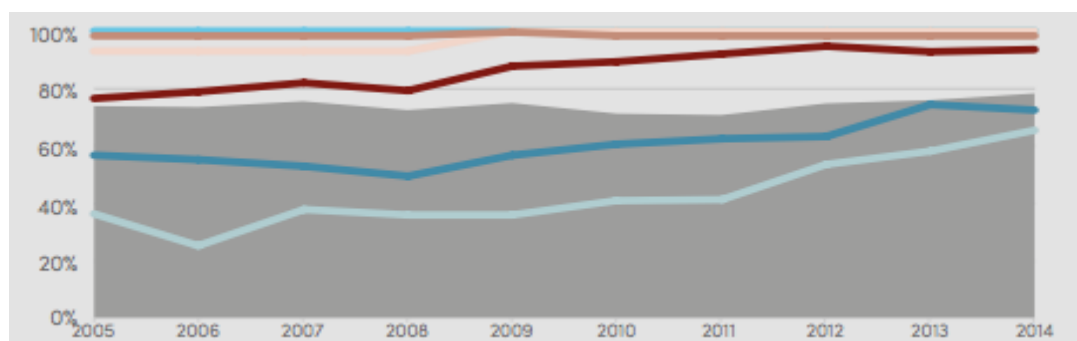
### **1.3. Diagnóstico de Malária**

Em qualquer doença, o seu diagnóstico, realizado o mais precocemente possível, é parte integrante da gestão eficaz e controlo da mesma doença. Este diagnóstico é realizado pela deteção do próprio parasita, nas suas diferentes formas, ou de substâncias por este produzidas, e que estejam presentes na corrente sanguínea do hospedeiro infetado. Na infeção de malária, dado a falta de especificidade dos sintomas iniciais de infeção, assim como o facto de as regiões onde a malária é ainda atualmente considerada endémica serem das que apresentam maiores índices de pobreza, é de extrema importância a existência de um método, de fácil utilização e baixos custos, que permita o seu diagnóstico inequívoco.

Os primeiros sintomas de malária são comuns às diferentes espécies do parasita, e são inicialmente bastante inespecíficos, podendo ser confundidos com os sintomas de uma gripe, dificultando assim o seu diagnóstico precoce. Em estados mais avançados, a malária pode levar a convulsões, ao estado de coma, anormalidades psicológicas, anemias ou insuficiências renais e respiratórias. Casos específicos revelaram número reduzido de plaquetas, níveis de bilirrubina no sangue superiores aos normais e aumento do volume do baço.

O diagnóstico de malária, para ser o mais exato possível, deve ter em consideração dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos.

Um método de diagnóstico de malária que apresente elevada sensibilidade e exatidão no resultado produzido, é extremamente importante, particularmente em zonas onde a malária é considerada endêmica, pois normalmente apresentam grupos sociais mais vulneráveis e, provavelmente, população não-imune. É igualmente importante um teste com elevada especificidade, reduzindo o uso de tratamentos desnecessários com fármacos anti-maláricos. Assim sendo, o diagnóstico inequívoco de infeções de malária, feito o mais precocemente possível, é crucial. Na Figura 1.10 estão apresentadas as proporções de casos de malária, registados em serviços públicos de saúde, aos quais foram aplicados testes de diagnóstico para esta doença, por região da OMS, no período compreendido entre 2005-2014.



**Figura 1.10.** Representação gráfica da proporção de casos de malária, que foram registados por serviços públicos de saúde, aos quais foi efetuado um teste de diagnóstico da infeção, por região da OMS, no período compreendido entre 2005-2014. A cinzento estão representados todos os casos registados globalmente. A azul claro estão representados os casos que ocorreram na região Africana. A azul estão representados os casos que foram registados na região das Américas. A azul escuro estão representados os casos que ocorreram na região mediterrânea da Europa. A amarelo aparecem representados os casos que aconteceram na Europa. A castanho estão representados os casos que foram registados na região do Sudoeste Asiático. A vermelho aparecem os casos ocorridos na região do Pacífico Este. Adaptado de Relatório Anual de Malária de 2015, Organização Mundial de Saúde.

Os métodos para diagnóstico laboratorial de malária podem ser divididos e classificados como diretos e indiretos. Os métodos diretos incluem microscopia ótica, microscopia de fluorescência, reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), testes serológicos (ELISA e IFAT), e testes de diagnóstico rápido, ou imunocromatográficos (TDR).

O diagnóstico de malária pode também ser realizado com recurso a métodos indiretos, como a citometria de fluxo ou a espectrometria de massa (MS, do inglês *Mass Spectrometry*).

### **1.3.1. Diagnóstico de Malária - Métodos Diretos**

#### **1.3.1.1. Microscopia Ótica**

A técnica de microscopia ótica permite a obtenção de um diagnóstico de malária com elevado grau de sensibilidade e especificidade, permitindo também a quantificação dos parasitas, assim como a identificação da espécie de *Plasmodium* responsável pela infecção. Este método consiste na análise de filmes de sangue (Moody, 2002; Tangpukdee *et al*, 2009). Esta técnica necessita de profissionais especializados para a sua execução, envolvendo custos elevados. Os equipamentos e reagentes necessários dificultam a disponibilidade e acessibilidade desta técnica em zonas onde a malária é considerada endêmica.

A microscopia ótica é, atualmente, considerado como a técnica *gold standard* para o diagnóstico de malária (Tangpukdee *et al*, 2009; Wilson, 2012).

#### **1.3.1.2. Microscopia de Fluorescência**

A microscopia de fluorescência é também um método pelo qual é possível realizar o diagnóstico de malária. Este método é baseado na afinidade que alguns corantes, que emitem fluorescência, têm para os ácidos nucleicos presentes no núcleo do parasita, ligando-se a estes. Estes corantes, quando são sujeitos a luz UV-visível, de um comprimento de onda específico, permitem que os núcleos emitam elevada fluorescência, o que possibilita a quantificação dos parasitas, por microlitro de sangue (Moody, 2002).

Os corantes mais usados são o laranja de acridina (AO, do inglês *Acridine Orange*) e a benzotiocarboxilpurina (BCP, do inglês *Benzothiocarboxypurine*), sendo que ambos são excitáveis no comprimento de onda de 490 nm, emitindo fluorescência de cor verde e amarela, respetivamente (Moody, 2002).

Apesar de ambos os corantes apresentarem bons níveis de intensidade de emissão, são pouco específicos, pois ligam-se a ácidos nucleicos de qualquer tipo de célula, sendo necessária a distinção entre as células dos parasitas que emitem fluorescência, das que apenas contêm ácidos nucleicos de detritos parasitários (Delacollette *et al*, 1994; Moody, 2002).

Este método necessita do trabalho de profissionais especializados e, material de elevado custo, sendo portanto uma técnica que não é prática de utilizar para diagnóstico automatizado em zonas endêmicas de malária (Tangpukdee *et al*, 2009).



Apresenta também como limitação a dificuldade em identificar as diferentes espécies de *Plasmodium*.

#### **1.3.1.3. Detecção de Sequências Específicas de Ácidos Nucleicos**

O diagnóstico de malária, baseado na detecção de ácidos nucleicos, por *Polymerase Chain Reaction* (PCR), é um método que apresenta igualmente uma elevada sensibilidade e especificidade. Embora esta técnica seja mais sensível que a microscopia ótica, permitindo detetar níveis de parasitemia de 1-5 parasitas/ $\mu$ L, (Moody, 2002; Tangpukdee *et al*, 2009), os resultados não estão normalmente disponíveis com a rapidez necessária para o estabelecimento de diagnóstico precoce (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2015). É uma técnica complexa, que exige profissionais especializados, e também equipamentos e reagentes de elevado custo.

Os resultados podem ser desafiantes de interpretar, uma vez que o DNA do parasita permanece na corrente sanguínea durante algum tempo após a infeção. Para além disso, a diferenciação entre uma infeção ativa e uma infeção já curada é difícil, uma vez que os níveis de parasitemia nem sempre são correlacionáveis com a progressão da infeção de malária (Moody, 2002; Redd *et al*, 1996). Esta técnica apresenta vantagens na sua utilização para a detecção de parasitas resistentes a fármacos e casos de infeções múltiplas.

Esta técnica é assim considerada como uma técnica de elevado custo para o diagnóstico de malária, estando normalmente restrita a laboratórios com profissionais especializados (Tangpukdee *et al*, 2009).

#### **1.3.1.4. Testes Serológicos**

Os testes serológicos detetam anticorpos produzidos contra o parasita da malária, através de imunofluorescência indireta, com a utilização de testes de imunofluorescência com anticorpos (IFAT, do inglês *Immunofluorescence Antibody Test*), ou através de ensaios imunoenzimáticos, através de ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Devido ao tempo necessário para o desenvolvimento de anticorpos, os testes serológicos não são considerados métodos práticos para o diagnóstico rotineiro da doença.

A detecção de anticorpos de malária por métodos serológicos, pode ser útil para avaliação qualitativa e quantitativa dos parasitas, assim como para efetuar a triagem de doadores de sangue em casos de transfusões sanguíneas envolvendo indivíduos que tenham tido infecções anteriores, dado que o nível de parasitemia pode ser demasiado baixo para que a sua detecção por microscopia ótica seja possível, ou para testes a pacientes que tenham sido tratados com fármacos anti-maláricos. Contudo, a sua utilização para diagnóstico rotineiro é questionável.

#### **1.3.1.4.1. Teste de Imunofluorescência com Anticorpos (IFAT)**

A imunofluorescência indireta pode ser utilizada para a detecção de anticorpos contra parasitas de malária, através de testes imunofluorescência com anticorpos (IFAT). Esta técnica utiliza dois anticorpos, um anticorpo primário que reconhece o antígeno alvo, e um anticorpo secundário, combinado com um fluoróforo, que reconhece o anticorpo primário e se liga a este.

A amostra é posteriormente examinada com um microscópio de fluorescência, sendo a detecção de fluorescência indicadora de resultado positivo no teste.

É considerado o teste serológico de referência para detecção de malária e, até bem recentemente, era o único método com utilização de anticorpos específicos de *Plasmodium* para a detecção de malária, em bancos de sangue (Wahlgren *et al*, 1983; Tangpukdee *et al*, 2009). Apesar de ser o teste serológico de referência para detecção de malária, a sua utilização para diagnóstico rotineiro em regiões onde a malária é considerada endémica não é possível devido à necessidade da produção de anticorpos, assim como a necessidade de equipamento de elevado custo e profissionais especializados.

É um teste de simples execução e com boa sensibilidade, mas que é demorado e não é um processo de possível automatização. Requer a utilização de um microscópio de fluorescência e profissionais especializados, sendo portanto um método com custos elevados (Tangpukdee *et al*, 2009).

#### **1.3.1.4.2. Ensaios de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)**

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos em amostras de plasma sanguíneo, e é frequentemente utilizado para determinação dos níveis de anticorpos em doentes com infeções parasitárias (Wahlgren *et al*, 1983).

Este método baseia-se na ligação de anticorpos de anti-*Plasmodium* presentes em amostras de soro, a antígenos que estão adsorvidos a uma placa. O resultado é visualizado

pela formação do complexo anticorpo-enzima. A adição de um substrato a este complexo resulta na formação de um produto colorido, confirmando o diagnóstico, e permitindo a fácil interpretação dos resultados obtidos.

É uma técnica que permite testar um grande número de amostras em simultâneo, sendo facilmente reprodutível e fácil de ser automatizado (She *et al*, 2006).

#### **1.3.1.5. Testes Imunocromatográficos, ou de Diagnóstico Rápido**

Com o reconhecimento da OMS da necessidade urgente de um método de diagnóstico para a deteção de malária, que apresente características como elevada sensibilidade, simples utilização, rapidez de produção de resultados e baixo custo, com o objetivo de ultrapassar as dificuldades inerentes à técnica de microscopia ótica, foram desenvolvidos vários métodos para a deteção da infeção destes parasitas.

Os testes de diagnóstico rápido (RDTs), são dispositivos que detetam antígenos de malária em amostras de sangue de pequeno volume, geralmente entre 5-15  $\mu$ L, através de ensaios imunocromatográficos com anticorpos monoclonais. Estes anticorpos, quando se ligam a antígenos do parasita, impregnados numa tira de teste, permitem o diagnóstico da doença, num curto período de tempo (Tanaka *et al*, 2006; Tangpukdee *et al*, 2009).

Segundo as recomendações apresentadas pela OMS para as características dos testes de diagnóstico rápido, estes devem apresentar uma sensibilidade superior a 95%, ter um limite de deteção mínimo de 2000 parasitas/ $\mu$ L e apresentarem resultados num curto espaço de tempo, inferior a 30 minutos. Pretende-se também que estes sejam comercializados em *kits* que contenham todos os reagentes necessários, e que não apresentem limitações como a necessidade de eletricidade ou da utilização de equipamento adicional, assim como a simplicidade de utilização do mesmo, sem que haja necessidade de recorrer a profissionais especializados (Moody, 2002; Murray *et al*, 2009; Wilson, 2012).

As principais vantagens dos testes de diagnóstico rápido são serem de fácil execução, não necessitando de profissionais especializados, apresentarem num curto espaço de tempo resultados fáceis de interpretar, não necessitar de equipamento adicional e de eletricidade, e normalmente o seu custo não é elevado (Bell *et al*, 2006; Kakkilaya *et al*, 2003; Murray *et al*, 2009; Singh *et al*, 1997).

Os testes de diagnóstico rápido, utilizados para o diagnóstico de malária tem sido classificados como de elevada qualidade (Chilton *et al*, 2006; Kyabayinze *et al*, 2008; Lee *et al*, 2008), tendo de igual modo sido referidos casos de elevadas variações na sensibilidade destes testes (Bell *et al*, 2006; Moody, 2002; Murray *et al*, 2008). Se estes dispositivos atingirem, ou superarem, os níveis de confiabilidade e eficácia das técnicas atualmente consideradas como

*gold standard*, como é o caso da microscopia ótica, podem vir a ter um papel muito importante na prática clínica.

As principais proteínas de *Plasmodium falciparum* usadas para a sua detecção são a proteína PfHRP II (*Histidine Rich Protein II* de *P. falciparum*) (Moody, 2002; Tangpukdee *et al*, 2009), a proteína PfHsp70 (*Heat Shock Protein 70* de *P. falciparum*) (Banumathy *et al*, 2002; Tangpukdee *et al*, 2009), o LDH (Lactato desidrogenase) (Moody, 2002; Tangpukdee *et al*, 2009) e a Aldolase de *Plasmodium spp* (Kakkilaya *et al*, 2003; Tangpukdee *et al*, 2009), e estas serão novamente abordadas no capítulo 1.4.

### **1.3.2. Diagnóstico de Malária - Métodos Indiretos**

Os métodos indiretos mais comuns, utilizados para o diagnóstico de malária, são citometria de fluxo, e espectrometria de massa (MS, do inglês *Mass Spectrometry*). São métodos que necessitam de profissionais especializados para a sua execução, necessitam de vários equipamentos e de vários reagentes, razões pelas quais não são considerados métodos adequados ou de possível execução em zonas endêmicas de malária, estando normalmente restritas a grandes laboratórios. São também métodos com custos associados bastante elevados.

#### **1.3.2.1. Citometria de Fluxo**

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas, como a dispersão da luz e a fluorescência, de partículas que se encontram em suspensão num líquido.

A suspensão líquida a analisar é introduzida no centro da câmara de fluxo, que se encontra preenchida por um fluido, e que apresenta uma velocidade muito superior à da suspensão líquida. Através de um fenómeno físico designado por focagem hidrodinâmica, as partículas são forçadas a moverem-se, em fluído laminar e uma a uma, no centro do fluxo, ficando alinhadas entre si (Doležel, 1997). Estas partículas são posteriormente sujeitas a um feixe de iluminação bastante intenso. Quando as partículas intersectam o feixe de luz, ocorre um processo de dispersão fotónica e/ou de emissão de fluorescência, cuja intensidade está dependente das características das partículas (Côrte-Real *et al*, 2002). Os fotões que são dispersos frontalmente vão ser recebidos e analisados por um fotodíodo, e os dispersos ortogonalmente, num ângulo de 90°, são recebidos por uma série de filtros óticos, sendo analisados em tubos fotomultiplicadores, que analisam propriedades como a dispersão lateral e fluorescência (Côrte-Real *et al*, 2002). Os diferentes tipos de filtros óticos dividem a emissão de

fluorescência, permitindo a medição simultânea de vários corantes fluorescentes (Doležel, 1991).

Quando a hemoglobina é degradada pelo parasita, liberta-se o grupo hemo e, por este composto ser tóxico, o parasita transforma-o em hemozoína. A hemozoína é um cristal birrefringente, ou seja, é capaz de desviar um plano de luz polarizada. Esta propriedade da hemozoína foi utilizada pela primeira vez no diagnóstico de malária por citometria, através da deteção da despolarização em leucócitos de doentes infetados (Hänscheid *et al*, 2001). No seguimento desse estudo, um outro foi efetuado em modelos animais (ratinhos infetados com *P. berghei*) e demonstrou-se que a deteção de hemozoína por citometria, pode estabelecer a base de um teste de sensibilidade, uma vez que, a presença de hemozoína no interior dos parasitas que infetam eritrócitos pode ser detetada por citometria de fluxo, permitindo a deteção de eritrócitos infetados e diferenciação os estádios de maturação do parasita (Frita *et al*, 2011).

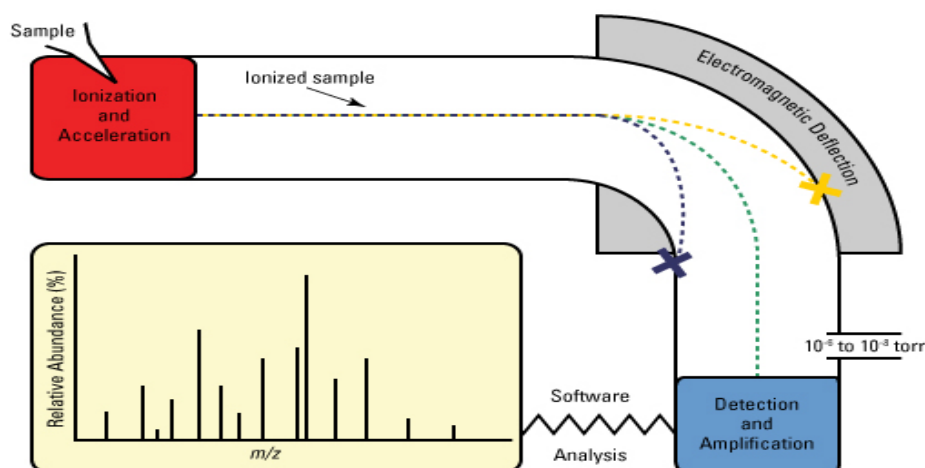
### **1.3.2.2. Espectrometria de Massa**

A espectrometria de massa é uma técnica analítica de identificação, quantificação e caracterização molecular e estrutural de amostras, com base na sua composição atómica.

As principais aplicações deste método são a identificação de compostos desconhecidos, quantificação da massa de amostras, análise das propriedades químicas e estruturais de moléculas ou deteção de transformações ocorrentes após a tradução, em proteínas. A utilização da técnica de MS, em conjunto com eletroforese bidimensional é uma estratégia bem estabelecida para análise proteómica (Rogowska-Wrzesinska *et al*, 2013). Neste projeto, a espectrometria de massa foi utilizada para a identificação das proteínas consideradas de maior interesse, após a realização da técnica de eletroforese bidimensional, e posterior análise dos resultados obtidos.

A espectrometria de massa apresenta elevada sensibilidade e seletividade, permitindo a deteção de proteínas, ou outros compostos, em quantidades, ou concentrações, na ordem de 5-200 ppm.

As etapas gerais de uma análise por espectrometria de massa estão representadas na figura 1.11.



**Figura 1.11.** Representação esquemática das principais etapas de uma análise por espectrometria de massa. As amostras são injetadas, e as moléculas são ionizadas e aceleradas. Estes íons são separados, de acordo com a sua razão massa / carga ( $m/z$ ), sendo estes posteriormente detetados e amplificados. Após a amplificação de sinal, são originados dados acerca da abundância relativa de cada íon, baseando-se novamente na sua razão  $m/z$ . Adaptado de *Overview of Mass Spectrometry for Protein Analysis* – ThermoScientif, 2015.

Embora existam várias técnicas diferentes para efetuar este método, todas elas partilham uma primeira etapa, que envolve a ionização da amostra, levando à formação de íons livres. O método de ionização depende da complexidade da amostra e alguns dos métodos mais comuns são o impacto de eletrões (EI), ionização química (CI), *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI), ionização por electrospray (ESI) ou *inductively-coupled plasma* (ICP).

Estes íons são posteriormente fragmentados e detetados, através da sua razão massa/carga ( $m/z$ ). A análise dos dados pode ser feita através de diversos métodos, como exemplo, o tempo de voo da amostra (TOF), o aprisionamento de íons (IT) ou *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR).

#### 1.4. Biomarcadores de Malária

Biomarcadores, ou marcadores biológicos, são compostos que, ao serem objetivamente analisados, são indicadores de processos biológicos normais, processos patogénicos, ou respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas. Esta definição foi apresentada em 1998, pelo *National Institutes of Health Biomarkers Definition Working Group*). No ano de 2001, a OMS definiu biomarcador como qualquer substância, estrutura ou processo, e subsequentes produtos, que pode ser mensurado no corpo humano e que influencia ou permite a previsão de algum acontecimento ou de doença. Ou seja, uma determinada substância que seja indicadora de um processo físico, químico, biológico, funcional, fisiológico, bioquímico a nível celular, ou

molecular, e que possa ser mensurada, pode ser um possível biomarcador (Programa Internacional de Segurança em Química – Biomarcadores e Avaliação de Risco – OMS, 2001). A utilização de biomarcadores não está apenas relacionado com a deteção ou previsão, e monitorização de doenças, mas também com o efeito de tratamentos, intervenções e até de exposição a ambientes nocivos. Para o diagnóstico da malária são maioritariamente utilizadas quatro proteínas, sendo estas a *PfHRPII*, a *PfHsp70*, a *PfLDH* e a *PfAldolase*, que vão ser descritas nos pontos abaixo.

#### **1.4.1. Proteína Rica em Histidina II, de *P. falciparum* (*PfHRPII*)**

As proteínas ricas em histidina (HRPs, do inglês *Histidine Rich Proteins*) de *P. falciparum* têm sido bastante utilizadas para o desenvolvimento de testes de diagnóstico rápido (RDTs) de malária, devido ao facto de estas terem sido identificadas, em todos os parasitas da espécie *Plasmodium falciparum*, independentemente do seu fenótipo (Beadle *et al*, 1994; *Histidine Rich Protein II – Malaria –in-vitro*, 2015).

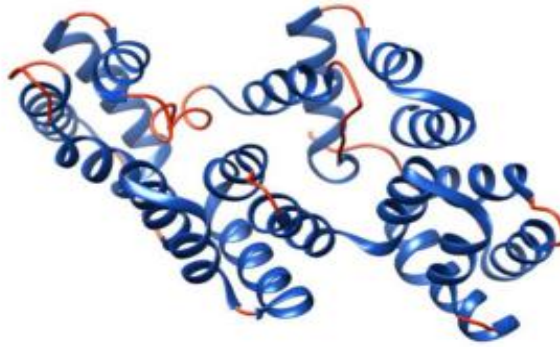
A *Histidine Rich Protein II* de *P. falciparum* (*PfHRPII*), é uma proteína solúvel em água, e é sintetizada pelo parasita na fase de reprodução assexuada. Esta proteína é expressa na membrana superficial de eritrócitos infetados, e foi também encontrada no citoplasma de eritrócitos infetados (Kakkilaya, 2003; Moody, 2002).

Esta proteína apresenta uma elevada composição em Histidina (H) e Alanina (A), 34% e 37% respetivamente, sendo também caracterizada por conter 51 repetições da sequência AHH (Baker *et al*, 2010).

É uma proteína de elevado interesse devido ao facto de ser produzida unicamente pela espécie *P. falciparum*, a espécie do parasita responsável por grande percentagem da taxa de mortalidade associada a esta doença. Esta proteína apresenta também elevada estabilidade em condições de temperaturas elevadas.

Está presente durante todo o ciclo de vida assexuado do parasita e, no final do ciclo, quando ocorre a rutura dos eritrócitos, a *PfHRPII* é libertada para a corrente sanguínea, podendo atingir concentrações na gama dos micromolar ( $\mu\text{M}$ ). Sendo exclusivamente expressa pela espécie *P. falciparum*, *PfHRPII* torna-se numa enorme vantagem para o diagnóstico da infeção de malária causada por esta espécie de parasita, sendo que a sua deteção na corrente sanguínea de indivíduos infetados é fácil, mesmo com um nível de parasitemia baixo (250 parasitas/ $\mu\text{L}$ ) (Baker *et al*, 2010).

Na Figura 1.12 está representado o modelo teórico da estrutura tridimensional desta proteína de *P. falciparum*, obtido através do PDB (*Protein Data Bank*) com o código 1L8M.



**Figura 1.12.** Representação do modelo teórico da estrutura tridimensional da proteína PfHRP2 (*Histidine Rich Protein II*, de *P. falciparum*) (PDB: 1L8M). A representação foi gerada pelo programa Chimera 1.9. A azul estão representadas as hélices- $\alpha$ , e a laranja estão representadas as estruturas denominadas *random coils*. Adaptado de *Protein Data Bank* (1L8M), 2015.

A função desta proteína ainda não é totalmente conhecida, mas pensa-se que a PfHRP2 possa atuar em diversas vias, como por exemplo, assumir o papel de uma hemopolimerase que destoxifica os grupo Hemo livres, convertendo-os em hemozoína, atuar na inativação dos processos de remodelação do citoesqueleto dos eritrócitos infetados, na modelação de respostas imunitárias e ainda na ligação a iões de  $Zn^{2+}$  (Beadle *et al*, 1994; *Histidine Rich Protein II* – Malaria –in-vitro, 2015).

A utilização da PfHRP2 como biomarcador de malária apresenta uma única desvantagem, relacionada com o seu tempo de persistência na corrente sanguínea, após eliminação do parasita, que normalmente é de cerca de 28 dias, após o início do tratamento (Kakkilaya, 2003), o que pode gerar uma falsa interpretação dos resultados como positivos. Outra desvantagem da utilização desta proteína deve-se ao facto de ser uma proteína polimórfica, ou seja, que contém diferentes estirpes, que variam consoante a zona endémica da qual foi isolado o parasita, podendo influenciar a sua deteção (Beadle *et al*, 1994).

#### 1.4.2. Proteína de Choque Térmico 70, de *P. falciparum* (PfHsp70)

As proteínas de choque térmico (Hsp, do inglês *Heat shock proteins*) são uma família de proteínas que existem na maioria das diferentes formas de vida, sendo altamente conservadas (Misra *et al*, 2009).

A sua principal função é a sua atividade como chaperonina molecular, ligando-se a proteínas que sofreram desnaturação e, através da promoção de *re-folding*, facilitam o seu retorno ao estado nativo. São proteínas solúveis em água. Geralmente, o seu pico de



expressão ocorre em condições de stress, nomeadamente em condições de exposição a temperaturas elevadas (Misra *et al*, 2009; Pavithra *et al*, 2007).

As proteínas *PfHsp70* apresentam um peso molecular de cerca de 70 kDa, e são constituídas por dois domínios distintos: um domínio N-terminal, de cerca de 45 kDa, que liga ATP, e um domínio C-terminal, de cerca de 25 kDa, domínio este que efetua ligação a péptidos (Shonhai *et al*, 2007).

É cada vez mais evidente o papel da proteína Hsp70 na estratégia de sobrevivência de *P. falciparum*, estando associada à passagem do sangue do mosquito, frio, para o sangue quente dos seres humanos, ou de outro hospedeiro vertebrado (Sharma, 1992; Shonhai *et al*, 2007). *PfHsp70-1*, a forma citosólica desta proteína, tem sido o principal alvo de pesquisa, pois pensa-se que esta desempenhe um papel importante no ciclo de vida do parasita, quer como chaperonina, quer como imunogénio (Bell *et al*, 2011; Shonhai *et al*, 2007).

Esta proteína é expressa durante o ciclo de vida assexuado do parasita, que ocorre dentro dos seres humanos (Mayer *et al*, 2005; Shonhai *et al*, 2007). Estudos recentes sobre esta proteína demonstraram que esta desempenha um importante papel na adaptação do parasita ao seu hospedeiro. Estas proteínas, de *P. falciparum*, foram encontradas noutros compartimentos celulares, fora do citoplasma do parasita, como na fenda de Maurer, o que pode ser indicativo do possível envolvimento destas proteínas na exportação das proteínas do parasita para os eritrócitos do hospedeiro (Lanzer *et al*, 2006; Vincensini *et al*, 2005). Em eritrócitos infetados, as proteínas Hsp70 estava, associadas às suas membranas, mas estas mesmas proteínas foram encontradas no citosol de células que não foram infetadas, o que sugere que em células infetadas, estas chaperonas possam participar no transporte de proteínas do parasita para o interior dos eritrócitos do hospedeiro (Banumathy *et al*, 2002).

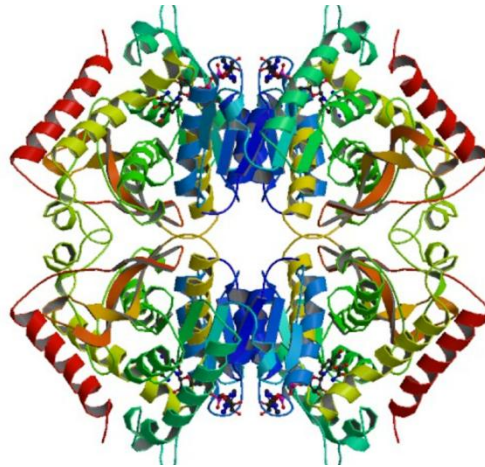
### 1.4.3. LDH e Aldolase

A lactato desidrogenase (LDH, do inglês *Lactate Dehydrogenase*) e a aldolase de *Plasmodium* também são usados como biomarcadores de malária, para o diagnóstico da mesma. Estas são produzidas por todas as espécies do parasita, e estão presentes na fase assexuada, não só no citoplasma dos eritrócitos, mas também nos gametócitos maduros (Meier *et al*, 1992; Shonhai *et al*, 2007)..

A aldolase de *Plasmodium* é uma enzima que é expressa na fase exo-eritrocítica da infeção, iniciando a sua expressão após a invasão dos eritrócitos. É solúvel em água, e é a principal enzima no ciclo da glicose do parasita.

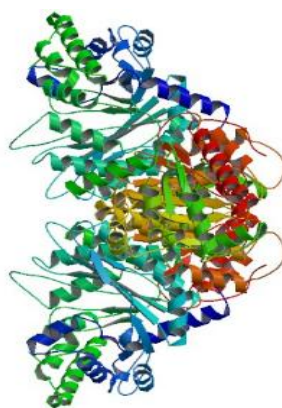
A aldolase desaparece do sangue rapidamente após o tratamento anti malárico (Kakkilaya *et al*, 2003; Moody, 2002; Rosenthal, 2012). Na figura 1.13 está representado o modelo teórico

da estrutura tridimensional da fructose-1,6-bifosfato aldolase de *P. falciparum*, obtida através do PDB (1A5C).



**Figura 1.13.** Representação do modelo teórico da estrutura tridimensional da enzima fructose-1,6-bifosfato aldolase, de *P. falciparum*). A imagem foi obtida através do PDB (1A5C).

A LDH de *Plasmodium* é uma também uma enzima integrante do ciclo da glicose do parasita, e é expressa tanto na fase de reprodução assexuada, como na fase de reprodução sexuada. Esta enzima encontra-se presente dentro dos eritrócitos infectados, e é libertada para a corrente sanguínea quando ocorre a rutura destes mesmos eritrócitos (Kakkilaya *et al*, 2003; Moody, 2002; Rosenthal, 2012; Shonhai *et al*, 2007). Na figura 1.14 está representado o modelo teórico da estrutura tridimensional da LDH de *P. falciparum*, obtida através do PDB (1LDG).



**Figura 1.14.** Representação do modelo teórico da estrutura tridimensional da enzima lactato desidrogenase (LDH) de *P. falciparum*. A imagem foi obtida através do PDB (1LDG).

## 1.5. Objetivos

O principal objetivo do presente projeto de investigação foi a identificação de biomarcadores em amostras de culturas de eritrócitos e soros humanos, infetados por *P. falciparum*, um parasita responsável pela doença da malária.

De forma a atingir este objetivo principal, foi realizada, numa primeira etapa deste projeto, uma otimização das quantidades relativas de proteínas presentes nas amostras, através da depleção das proteínas de maior abundância e peso molecular, nomeadamente, a proteína albumina. Esta primeira etapa teve também como objetivo, a otimização das amostras para a realização da segunda etapa deste projeto, a realização da técnica de eletroforese bidimensional, que permitiu a separação das várias proteínas de cada amostra de acordo com o seu ponto isoelétrico, numa primeira dimensão, e peso molecular, numa segunda dimensão. Numa terceira etapa foi efetuada a identificação dos antígenos específicos de *P. falciparum* em amostras de soro humano infetado pelo parasita, assim como de proteínas humanas cujos níveis de expressão apresentaram variações significativas, comparativamente ao de amostras não infetadas, através da análise dos padrões de *spots* proteicos de cada amostra. Posteriormente, os *spots* proteicos considerados de maior interesse, foram excisados e analisados através da técnica de espectrometria de massa, e as proteínas correspondentes a cada *spot* foram identificadas através da técnica de *Peptide Mass Fingerprint*

O objetivo final deste trabalho é a utilização das proteínas identificadas como alvos antígenicos para o diagnóstico de malária.

## 1.6. Principais Técnicas Utilizadas

A primeira etapa deste projeto teve como objetivo a otimização das quantidades relativas das proteínas presentes nas amostras de sobrenadantes de culturas de sangue, e amostras de soros humanos, através da depleção das proteínas de maior abundância e peso molecular, como a albumina, dado que a presença desta proteína pode impossibilitar a visualização e identificação de outras proteínas menos abundantes e de menor peso molecular. Esta otimização foi feita através da depleção de albumina das diferentes amostras de sobrenadantes de culturas de sangue e soros humanos. Para a avaliação dos resultados desta etapa de otimização das amostras, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

Após otimização das quantidades relativas das proteínas presentes nas diferentes amostras de sobrenadantes de culturas de sangue e soros humanos, foi realizada a técnica de eletroforese bidimensional (2DE). Esta técnica foi utilizada para permitir a separação das

diferentes proteínas das várias amostras de acordo com o seu ponto isoelétrico, numa primeira dimensão, e de acordo com o seu peso molecular, numa segunda dimensão. Esta técnica permitiu a obtenção de géis de poliacrilamida que apresentavam um padrão de *spots* proteicos, em que cada *spot* correspondia a uma proteína.

Os géis de poliacrilamida, que apresentavam os padrões de *spots* proteicos de cada amostra, foram então analisados através do *software Melanie 7.0*, da GeneBio. Esta análise teve como objetivo a identificação de proteínas de possível interesse para a sua utilização como biomarcadores, nomeadamente, proteínas que não se encontrassem na amostra controlo, mas na amostra infetada. São de também de interesse proteínas que apresentem níveis significativos de expressão nas diferentes amostras.

### **1.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE)**

Como referido anteriormente em 1.6., esta técnica foi utilizada, neste projeto, para a visualização dos resultados da etapa de otimização das quantidades relativas das proteínas presentes nas amostras, nomeadamente albumina.

A eletroforese é um método de separação, baseado nas diferenças de mobilidade eletroforética, quando aplicado um campo elétrico, permitindo que a separação de diferentes moléculas eletricamente carregadas, em solução. Geralmente, a migração de uma molécula depende de dois fatores, o seu tamanho e carga, o que se traduz em diferentes mobilidades eletroforéticas no gel de separação.

Foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes, (SDS-PAGE, do inglês *Sodium-Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), que permite a visualização das diferentes proteínas das amostras, separadas de acordo com a seu peso molecular.

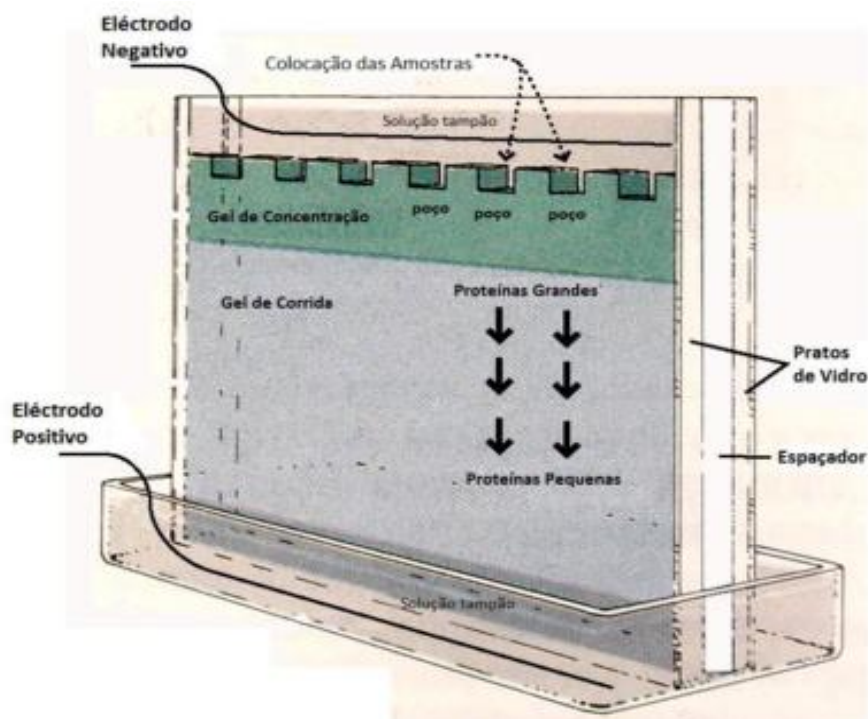
O gel de poliacrilamida é formado através da polimerização de monómeros de acrilamida, na presença de bisacrilamida. A variação das concentrações de acrilamida e bisacrilamida permite definir o tamanho dos poros do gel, sendo estes tão mais pequenos quanto maior for a concentração, ou percentagem, do gel (Butler, 2005). O processo de polimerização é iniciado pela formação de radicais livres pelo persulfato de amónia (APS, do inglês *Ammonium Persulfate*), sendo estabilizados pela adição do composto N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED). A polimerização leva à formação de uma longa cadeia de monómeros de acrilamida, com ligações cruzadas formadas devido à presença do agente conector, a bisacrilamida (Butler, 2005).

O dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *Sodium-Dodecyl Sulfate*), é um agente desnaturante, carregado negativamente, usado para a redução de moléculas hidrofóbicas, e pela quebra das interações não-covalentes, reduzindo a proteína à sua estrutura primária. Este detergente é normalmente utilizado com  $\beta$ -mercaptoetanol, um agente redutor responsável pela quebra de pontes de dissulfureto, formadas pelas cadeias laterais de cisteínas, garantindo que as proteínas adotem uma estrutura primária, e linear, levando à sua desnaturação. Para além de adquirirem uma estrutura linear, as proteínas ficam também carregadas com carga negativa. Assim sendo, as proteínas desnaturadas, e carregadas negativamente, são sujeitas a um campo elétrico aplicado e tendem a migrar para o polo positivo, ou cátodo, sendo então a sua migração apenas dependente do seu tamanho, e não da sua carga.

Para facilitar a monitorização e interpretação dos resultados no gel de poliacrilamida, é utilizado um agente corante, normalmente azul Coomassie, que se liga especificamente a proteínas, possibilitando o aparecimento dos resultados sob a forma de bandas, indicadoras de presença de proteínas de determinado peso molecular.

É extremamente importante o uso de um marcador de pesos moleculares, a atuarem como referência para a interpretação e comparação dos resultados obtidos, permitindo assim estimar o peso molecular da proteína alvo ou uma análise da pureza da solução. Através da comparação das diferentes mobilidades eletroforéticas (distâncias percorridas no gel), com as amostras de referência, é possível construir uma reta de calibração para o cálculo do peso molecular da nossa amostra.

O gel de poliacrilamida utilizado na técnica de SDS-PAGE é dividido em duas secções, sendo estas o gel de concentração e o gel de corrida. O gel de concentração tem o objetivo de colocar todas as proteínas ao mesmo nível, para que, quando entrarem no gel de corrida, comecem todas a partir do mesmo ponto, para que seja possível efetuar uma análise comparativa. Na Figura 1.15 está representado esquematicamente o material utilizado para esta técnica, assim como estão assinalados os dois géis utilizados. É também apresentado o princípio e sentido da migração das proteínas no gel.



**Figura 1.15.** Representação da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE). As proteínas inseridas no gel, migram do polo negativo, para o polo positivo e, após a sua entrada no gel de corrida, ou separação, estas são separadas de acordo com o seu peso molecular. Moléculas de menor peso molecular migram mais, e vice-versa. Adaptado de *SDS-PAGE Gel Electrophoresis*, Chemistry Gatech, 2015.

### 1.6.2. Eletroforese Bidimensional (2DE)

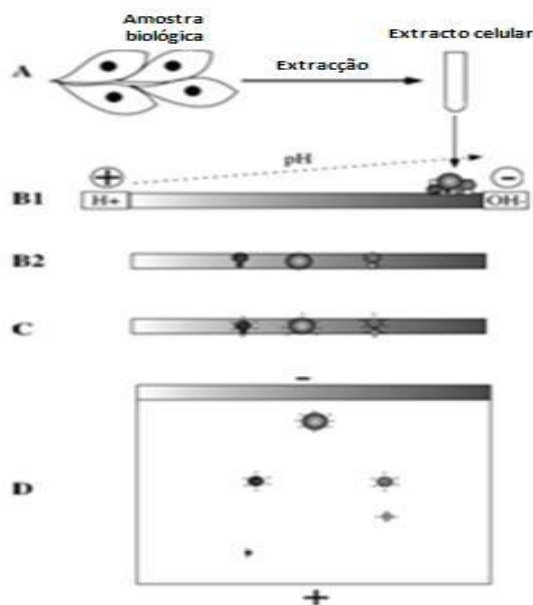
A técnica de eletroforese bidimensional (2DE) pode ser utilizada para resolver misturas complexas de milhares de proteínas. Tal como o nome da técnica indica, a separação das proteínas das amostras é feita em duas dimensões distintas.

Na primeira dimensão, as proteínas são separadas com base em diferenças de ponto isoelétrico (pI), que corresponde ao valor de pH no qual as proteínas apresentam uma carga total neutra, através da realização da técnica de focagem isoelétrica.

Na segunda dimensão, por sua vez, são separadas de acordo com o peso molecular, através da técnica de eletroforese SDS-PAGE.

Uma vez terminado o processo de separação, os géis provenientes da eletroforese bidimensional, são corados para permitir a visualização da proteína ou proteínas em análise. Em combinação com sistemas de avaliação de imagem assistida por computador para análise qualitativa e quantitativa de proteomas, esta técnica de eletroforese de proteínas permite a sua catalogação, e posterior comparação dos resultados obtidos (Rabilloud *et al*, 2011).

Uma representação das principais etapas de uma análise por eletroforese bidimensional encontra-se na Fig 1.16.



**Figura 1.16.** Esquema representativo da eletroforese 2D em gel de poliacrilamida (2D PAGE). O início do processo ocorre com a extração de proteínas a partir da amostra biológica de estudo de modo a obter uma amostra compatível com a etapa de focagem isoeletrica (A). A amostra é de seguida carregada numa tira de poliacrilamida com um gradiente de pH imobilizado (B1) que se encontra orientada com a zona ácida no ânodo, e a zona básica no cátodo. Durante a realização da focagem isoeletrica, a primeira dimensão, as proteínas migram até atingirem o seu ponto isoelétrico (pI) (B2). De seguida, a tira proveniente da primeira dimensão é equilibrada com um tampão que contém SDS, com o objetivo de garantir que todas as proteínas se tornam carregadas negativamente (C). A tira de poliacrilamida proveniente da etapa de focagem isoeletrica é então carregado num gel SDS-PAGE para dar início à segunda dimensão do processo de separação onde as proteínas serão separadas de acordo com o seu peso molecular (D). Adaptado de Rabilloud *et al*, 2002.

Previamente à realização desta técnica, é essencial a preparação das diferentes amostras. Esta preparação tem como objetivo a solubilização de todas as proteínas, sem que seja necessário qualquer tipo de modificação adicional durante o processo de separação, de uma forma que seja compatível com a primeira dimensão de separação, a focagem isoeletrica, estando esta, por sua vez, sujeita a vários tipos de restrições. Em primeiro lugar, a carga das proteínas não deve, de qualquer maneira, sofrer alterações. Isto significa que não devem ser utilizados detergentes iónicos, como o SDS. Neste sentido, recorre-se à utilização de compostos químicos sem carga (não iónicos ou zwitteriónicos). São também utilizadas combinações de agentes caotrópicos e detergentes, uma vez que os primeiros são excelentes agentes de desnaturação e solubilização de proteínas, pois são responsáveis pela quebra de ligações de hidrogénio, impedindo a agregação ou formação de estruturas secundárias

indesejadas que afetem a mobilidade das proteínas. Agentes caotrópicos neutros, como a ureia e a tiourea, são normalmente utilizados. No entanto, a ação única de agentes caotrópicos não é suficiente, uma vez que estes agentes, não dissolvem de forma eficiente lípidos celulares e não são capazes de manter as proteínas suficientemente solúveis, nas condições utilizadas durante o processo de focagem isoelétrica. Assim, durante a preparação da amostra, são também adicionados detergentes eletricamente neutros (p.e. CHAPS) e compatíveis com os agentes caotrópicos que se utilizem no processo de separação, atuando, ao quebrar interações hidrofóbicas de modo a aumentar a solubilidade de proteínas no seu pI. É preciso também ter em conta a elevada intensidade de campo elétrico necessária para o passo de focagem isoelétrica, uma vez que a carga das proteínas tende a diminuir progressivamente, à medida que estas se aproximam do seu ponto isoelétrico (pI). Neste sentido, e para que as proteínas migrem a uma velocidade constante até ao seu pI devem ser utilizados campos elétricos muito altos. Por sua vez, a utilização de forças de campo elevadas requer baixa força iónica, devido ao aquecimento das amostras, o que significa que se torna extremamente difícil quebrar interações iónicas durante a preparação de amostras para realização de eletroforese bidimensional, sendo por isso, por vezes utilizados anfólitos transportadores, que são responsáveis pela neutralização de sais na amostra.

A última advertência a ter em conta na preparação das amostras, diz respeito a modificações nas proteínas que podem ocorrer durante este processo. Estas modificações podem ser, por exemplo, induzidas pela presença de ureia, ou até provocadas pela presença de proteases que permanecem cativas durante a preparação da amostra, presumindo que a combinação de inibidores de proteases (p.e. PMSF) e a desnaturação das proteínas induzida por agentes caotrópicos é suficiente para ultrapassar este problema. No entanto, em determinadas amostras, isto pode não se verificar, razão pela qual existem inúmeros protocolos otimizados para cada tipo de amostra (Rabilloud *et al*, 2011).

A etapa de focagem isoelétrica (IEF, do inglês *Isoelectric Focusing*) preparação da amostra, a focagem isoelétrica por si só é menos problemática e, geralmente, muito mais simples, especialmente quando são utilizadas tiras de gel de poliacrilamida com gradientes de pH imobilizados (IPG strips). No entanto, existem alguns pontos que merecem atenção como a estratégia de aplicação, o perfil de tensão e a precipitação isoelétrica. O perfil de tensão é uma consequência direta da utilização de campos de elevada intensidade na focagem isoelétrica. Muitas vezes, em amostras biológicas existem sais que podem induzir um forte aquecimento, se uma alta intensidade de campo for aplicada de uma só vez.

Este método depende essencialmente do transporte de moléculas anfotéricas ao longo de um gradiente de pH imobilizado em tiras de gel de poliacrilamida. Quando a corrente elétrica é aplicada, moléculas com pI elevado tendem a migrar em direção ao ânodo, enquanto que, moléculas com menor valor de pI tendem a migrar em direção ao cátodo (proteínas movem-se inicialmente em direção ao eletrodo com carga oposta). Durante a migração, ao longo do gradiente de pH, as proteínas ganham ou perdem prótons, e, vão gradualmente perdendo



carga e mobilidade, provocando uma diminuição da velocidade de migração. Quando a proteína atinge um valor de pH igual ao seu ponto isoelétrico a migração para. O resultado é a focagem das várias proteínas, através dos valores de pI respectivos, ao longo de um gradiente de pH. A principal desvantagem desta técnica é a tendência de moléculas como o DTT têm de se movimentar em direção ao cátodo como consequência do gradiente, o que provoca uma redução da reprodutibilidade desta técnica (Rabilloud *et al*, 2011).

As proteínas das diferentes amostras são reduzidas, através da utilização de DTT, um detergente que provoca a clivagem das pontes dissulfureto, sendo posteriormente alquiladas, através da utilização de iodoacetamida, um agente alquilante que impede a formação de pontes dissulfureto entre os aminoácidos cisteína. Finalizada a etapa de IEF, as proteínas das amostras que foram separadas de acordo com o seu pI, são revestidas com SDS, um detergente aniônico, que confere carga negativa a todas as proteínas, promovendo assim a sua mobilidade na segunda dimensão. Deve ter tido em conta, que as proteínas, são suscetíveis de estar relativamente insolubilizadas no gel de focagem isoelétrica, especialmente quando são utilizados gradientes de pH imobilizado. Deste modo, é aconselhável começar a eletroforese SDS-PAGE, aplicando uma baixa tensão, para dar tempo para que a frente de SDS volte a solubilizar as proteínas durante a passagem por toda a faixa de gradiente de pH imobilizado.

De seguida, a eletroforese SDS-PAGE pode ser conduzida da forma convencional. Neste processo ocorre separação das proteínas de acordo com o seu peso molecular. No entanto, ao invés da inserção da amostra de proteína nos poços, a tira proveniente da primeira dimensão de separação (focagem isoelétrica) é colocada no topo do gel SDS-PAGE, e este é selado com uma solução de agarose.

O resultado final da utilização da técnica de eletroforese bidimensional, é a obtenção de um gel bidimensional com distribuição de acordo com o pI e peso molecular das proteínas, na mistura em análise. (Rabilloud *et al*, 2011; Righetti *et al*, 2004).

### **1.6.3. Análise de Padrões de *Spots* Proteicos, Obtidos por Eletroforese Bidimensional (2DE), Através do *Software Melanie 7.0***

A deteção de padrões de *spots* proteicos, assim como a sua correta segmentação, são componentes fundamentais na análise dos resultados de géis de eletroforese bidimensional (2DE).

Existem vários métodos para a deteção e análise de padrões de *spots* proteicos. Neste projeto foi utilizado o *software Melanie 7.0*, GeneBio. Para a obtenção dos melhores resultados com este *software*, é necessária a intervenção do utilizador, processo este que pode conduzir a interpretações subjetivas e resultados não-reprodutíveis.

A análise de padrões de *spots* proteicos pode ser dividida em quatro fases, sendo estas (Anjos *et al*, 2011; Savelonas *et al*, 2012):

- Detecção de *spots*;
- Segmentação de *spots*, ou seja, assegurar que cada *spot* que foi detetado corresponde a um único spot, e não a sobreposição de vários;
- Quantificação de *spots*;
- Alinhamento e comparação das diferentes imagens;

Devido à importância da correta interpretação dos resultados de géis de eletroforese bidimensional, têm sido desenvolvidas várias soluções a nível do software (Magdeldin *et al*, 2012), para além do *Melanie 7.0*, que foi utilizado neste projeto, *DeCyder 2D* (GE Healthcare), *ImageMaster 2D* (GE Healthcare), *Delta2D* (BioTechnikum) ou *Progenesis Samespots* (Nonlinear Dynamics).

#### **1.6.4. Análise por Espectrometria de Massa (MS)**

A análise por espectrometria de massa foi realizada com a combinação das técnicas MALDI-TOF/TOF e MS/MS. O método MALDI-TOF é um método bastante utilizado para a identificação de proteínas, devido à simplicidade desta técnica, excelente precisão no cálculo de massas e elevada sensibilidade e resolução (Aebersold *et al*, 2003).

O método MALDI-TOF requer a clivagem proteólica das diferentes amostras de proteínas, assim como a sua redução e alquilação, com o objetivo de quebrar as ligações dissulfureto estabelecidas entre os resíduos de cisteína e impedir que estas se voltem a formar, mantendo as proteínas na sua estrutura primária.

No método MALDI (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*) a amostra é misturada com uma matriz que absorve na região de ultravioleta, impedindo que a amostra seja destruída pelo feixe de laser. A matriz é ionizada quando a energia do laser é convertida em energia térmica, o que faz com que as moléculas da matriz transfiram prótons para a amostra, ionizando-a. Este é o método mais comum para a ionização de proteínas para análise de MS (Fenn *et al*, 1989).

O método TOF (*Time Of Flight*) utilizado para a análise do feixe de iões, correspondente ao tempo de voo, em que iões com diferente razão massa/carga ( $m/z$ ),

adquirem a mesma energia cinética na presença de um campo elétrico. Neste caso as velocidades dos iões dependem unicamente da sua massa, logo os iões mais leves movem-se mais rapidamente do que os iões mais pesados, tendo consequentemente tempos de voo menores. No método TOF/TOF, as diferentes razões  $m/z$ , são seleccionadas no primeiro aparelho TOF e, após a fragmentação das amostras, os fragmentos são separados de acordo com a sua massa, numa segundo aparelho TOF (Aebersold *et al*, 2003).

Numa análise MALDI-TOF as amostras são previamente dissolvidas e dispersas numa matriz, geralmente um ácido orgânico, sendo posteriormente colocadas numa placa MALDI que, após evaporação do solvente, é introduzida na fonte MALDI, onde os cristais são irradiados por um feixe laser.

Com o objetivo de complementar os dados obtidos por MALDI-TOF, esta técnica foi combinada com a técnica de *Tandem Mass Spectrometry* (MS/MS). Esta técnica permite aumentar a quantidade de informação recolhida de cada péptido da amostra, através da sua fragmentação (Pandey *et al*, 2000).

#### **1.6.5. Identificação Das Proteínas Analisadas Por Espectrometria De Massa – *Peptide Mass Fingerprint***

O *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) é um método rápido e de elevada sensibilidade, para a identificação de proteínas, tornando-se cada vez mais um método essencial para análise proteómica (Dodds *et al*, 2008; Henzel *et al*, 2003; James *et al*, 1993; Mann *et al*, 1993; Pappin *et al*, 1993; Yates III *et al*, 1993). Esta análise baseia-se na digestão peptídica das diferentes proteínas realizada para a análise de MS, que origina uma mistura destes péptidos, aos quais corresponde um determinado conjunto de dados, denominado por *peptide mass fingerprint* (Pappin *et al*, 1993). Estes dados obtidos, são posteriormente comparados, com o recurso a uma base de dados que contém informação acerca das diferentes sequências de péptidos, que constituem o proteoma de um determinado organismo, encontrando assim a melhor correspondência para a sequência em análise (Webster *et al*, 2009).

O PMF é atualmente uma das ferramentas mais utilizadas na identificação de proteínas, separadas por eletroforese bidimensional (Damodaran *et al*, 2007). Esta técnica está sujeita a resultados considerados “falsos-positivos”, mas continua, contudo, a ter um papel importante na análise proteómica, devido ao facto de ser uma técnica rápida, de baixo custo e de boa fiabilidade para a identificação de proteínas (Dodds *et al*, 2008).



## **2. Materiais e Métodos**



## 2.1. Amostras Analisadas

Na fase inicial deste projeto, foram estudadas amostras de sobrenadantes de culturas de eritrócitos, não infectados, e infectados por *P. falciparum* da estirpe 3D7, que apresentavam diferentes níveis de parasitemia (10%, 20% e 22%).

Posteriormente, foi possível a obtenção de amostras de soros humanos. As amostras de soros humanos foram recolhidas de um indivíduo saudável, de um indivíduo saudável, com historial clínico de malária, e de um indivíduo infectado com malária aguda.

Foi ainda possível, na fase final deste projeto, a obtenção de amostras de plasmas humanos, que foram recolhidos com inibidores de proteases, e armazenadas a uma temperatura de -80°C, com o objetivo de preservar na sua totalidade o conteúdo proteico das diferentes amostras.

**Tabela 2.1.** Descrição das amostras utilizadas ao longo deste projeto, contendo informação acerca do tipo de amostra, presença ou ausência de infeção, e outras informações relevantes para cada tipo de amostra estudada.

Tipo de Amostra	Presença / Ausência de Infeção	Estado clínico do dador	Grau de Parasitemia
<b>Sobrenadantes de Culturas de Eritrócitos (IMM)</b>	Não Infectado	-	-
	Infectado, por <i>P. falciparum</i> , da estirpe 3D7	-	10%
<b>Sobrenadantes de Culturas de Eritrócitos (IHMT)</b>	Não Infectado	-	-
	Infectado, por <i>P. falciparum</i> , da estirpe 3D7	-	20%
	Infectado, por <i>P. falciparum</i> , da estirpe 3D7	-	22%
<b>Soros Humanos (IHMT)</b>	Não Infectado	Saudável	-
	Não Infectado	Saudável, com historial clínico de malária	-
	Infectado por <i>P. falciparum</i>	Infecção de malária aguda	-
<b>Plasmas Humanos (IHMT)</b>	Não Infectado	Saudável	-
	Não Infectado	Saudável	-
	Não Infectado	Saudável	-
	Não Infectado	Saudável	-
	Infectado por <i>P. falciparum</i>	Infecção de malária	-

### **2.1.1. Amostras de Sangue Total, Soro e Plasma Humano**

As amostras de Sangue Total, Soro e Plasma humano utilizadas nesta dissertação foram gentilmente cedidas pelo Dr. Miguel Prudêncio, do Instituto de Medicina Molecular (IMM), Lisboa.

### **2.1.2. Amostras de Sobrenadantes de Cultura de Eritrócitos Não Infetada e Infetada com *Plasmodium falciparum*, com um nível de parasitemia de 10% (cedidas pelo IMM)**

As amostras de sobrenadantes de culturas de eritrócitos, não infetada, e infetada com *Plasmodium falciparum* da estirpe 3D7, com um grau de parasitemia de 10%, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Miguel Prudêncio, do Instituto de Medicina Molecular (IMM), Lisboa.

As amostras foram preparadas pela separação de eritrócitos, através do gradiente de Ficoll, para a obtenção da amostra de sobrenadante de cultura não infetada. Para a obtenção da amostra de sobrenadante de cultura infetada, foram adicionados, aos eritrócitos não infetados, outros eritrócitos que foram previamente infetados com *P. falciparum* da estirpe 3D7. Esta amostra foi incubada num meio, que permitiu o aumento do nível de parasitemia até 10%.

Os eritrócitos de ambas as amostras foram então centrifugados a uma velocidade de 800g, durante 5min, a uma temperatura de 4°C. Foi descartado o sobrenadante, e o sedimento foi lavado com PBS (do inglês *Phosphate-Buffered Saline*), tendo-se posteriormente procedido à lise dos eritrócitos com uma solução de 0,15% de Saponina.

### **2.1.3. Amostras de Sobrenadantes de Cultura de Eritócitos Não Infetada e Infetadas com *Plasmodium falciparum*, com um nível de parasitemia de 20% e 22% (cedidas pelo IHMT)**

As amostras de sobrenadantes de culturas de eritrócitos não infetada, e infetadas com *Plasmodium falciparum* da estirpe 3D7, que apresentavam um nível de parasitemia de 20% e 22%, foram gentilmente cedidas pela Dra. Fátima Nogueira, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Lisboa.

Para a preparação da cultura não infetada, constituída por eritrócitos saudáveis, foi colhido o sangue venoso de um dador, após a confirmação de que este não tinha previamente tomado fármacos anti maláricos, ou qualquer outro medicamento. O sangue venoso foi diretamente recolhido para uma seringa com anticoagulante, tendo sido posteriormente transferidos para



tubos a vácuo, que também continham o agente anticoagulante. O anticoagulante utilizado foi heparina.

O sangue foi posteriormente transferido para tubos de centrífuga de 15mL, e centrifugado durante 5min, a uma velocidade de 2 000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante, composto maioritariamente por plasma e glóbulos brancos, foi retirado e descartado. O sedimento foi então lavado com PBS, e novamente centrifugado durante 5min, a uma velocidade de 2 000 rpm. O sobrenadante foi outra vez recolhido e descartado. Este passo foi repetido por 4 vezes.

Foi então adicionado ao sedimento, constituído por eritrócitos lavados, o mesmo volume de meio RPMI completo (RPMI-1640 (*Sigma*); Hepes (*Sigma*); Albumax (*Liquid Rich Bovine Serum Albumin (Gibco)*; Hipoxantina (*Sigma*); NaHCO<sub>3</sub>). O meio RPMI completo foi filtrado para frascos previamente autoclavados, com o objetivo de manter as suas condições de esterilização.

Posteriormente à adição do meio, as amostras são sujeitas a um teste de esterilização, sendo incubadas durante um período de 48 horas, numa estufa de CO<sub>2</sub>, a uma temperatura de 37°C.

De seguida, as amostras são armazenadas a uma temperatura de 4°C, podendo ser conservadas durante um período máximo de 3 semanas, nestas condições.

Para a obtenção das amostras de culturas infetadas por *P. falciparum*, da estirpe 3D7, é necessário realizar, em primeiro lugar, a sincronização das culturas, com uma solução de 5% de sorbitol, para possibilitar a obtenção de anéis de eritrócitos. Para a realização desta etapa, as culturas são centrifugadas a uma velocidade 2 500 rpm, durante 5min, sendo posteriormente retirado o sobrenadante, e descartado. De seguida, são adicionados 10mL de solução de 5% sorbitol, estéril, por cada 10mL de cultura iniciais. A amostra é então incubada durante um período de 10min, a uma temperatura de 37°C, sendo agitada aos 5min.

A amostra é posteriormente centrifugada, nas mesmas condições anteriormente referidas, e após ser retirado o sobrenadante, são adicionados 10mL de meio RPMI completo. A amostra é novamente centrifugada, nas mesmas condições. O sobrenadante é descartado, e são mantidas as condições de cultura, com um hematócrito de 5%.

Para a obtenção de culturas com trofozoítos maduros, e esquizontes, é necessária a realização de outra etapa de sincronização, sendo esta efetuada com uma solução de *Nicodenz AG 55% (Progen)*. Esta solução de *Nicodenz* permite a criação de um gradiente de densidade nos tubos das amostras, permitindo a separação das diferentes formas de vida do parasita que estejam presentes. Para esta sincronização, as amostras são centrifugadas, durante um período de 5min, a uma velocidade de 2 500 rpm, e após ser retirado o sobrenadante, são adicionados 5mL de PBS ao sedimento, composto por eritrócitos.

Num novo tubo de centrífuga, são adicionados 10mL de *Nicodenz* e, cuidadosamente, 5mL de cultura com PBS, anteriormente preparada. As culturas são então centrifugadas, durante um período de 20min, a uma velocidade de 1 100g, e a uma temperatura de 22°C.

Após a centrifugação, é cuidadosamente retirado o sobrenadante. É então recolhido o anel de eritrócitos, e lavado com PBS.

Posteriormente, as culturas são mantidas, em condições de 5% de hematócrito, incubadas numa estufa de CO<sub>2</sub>, a uma temperatura de 37°C.

Através da sincronização com *Nicodenz*, é possível a produção de culturas ricas em trofozoítos maduros e esquizontes, tendo estas culturas um nível de parasitemia superior a 20%.

#### **2.1.4. Amostras de Soro Humano de Indivíduo Saudável, Indivíduo Saudável com Historial Clínico de Malária e Indivíduo Infetado com Malária Aguda de *P. falciparum* (cedidas pelo IHMT)**

As amostras de soro de origem humana, utilizadas nesta dissertação, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Marcelo Silva, do IHMT, Lisboa.

As amostras correspondiam a colheitas de sangue de um indivíduo saudável, de um indivíduo saudável com historial clínico de malária, e de um indivíduo infetado com malária aguda.

Estas amostras foram colhidas sem a adição de quaisquer inibidores de proteases, e posteriormente armazenadas a uma temperatura de -20°C.

#### **2.1.5. Amostras de Plasma Humano de Indivíduos Saudáveis, com ou sem Historial Clínico de Malária, e de Indivíduo com Infecção de Malária de *P. falciparum* (cedidas pelo IHMT)**

As amostras de plasmas humanos foram recolhidas e fornecidas pelo grupo de investigação da Dra. Fátima Nogueira, do IHMT, de Lisboa.

As amostras foram recolhidas, com o necessário consentimento informado e aprovação do conselho ético do IHMT, de seis indivíduos. A designação de cada amostra, o estado clínico de cada indivíduo e o historial clínico de malária, podem ser consultados na tabela 2.2.

**Tabela 2.2.** Designação das amostras de plasma humano, cedidas pelo IHMT. Estão também apresentados os dados relativos ao estado clínico de cada dador aquando da colheita da amostra. Estão também apresentadas informações referentes ao historial clínico de malária de cada indivíduo.

Designação da Amostra	Estado Clínico do Dador	Historial Clínico de Malária (nº episódios)
A1	Infeção por <i>Plasmodium falciparum</i>	2
A3	Saudável	2
A4	Saudável	2
A5	Saudável	0
A6	Saudável	<2
A7	Saudável	5-6

As amostras de sangue periférico foram recolhidas diretamente para tubos com EDTA, e imediatamente após a sua colheita, foi adicionada uma pastilha de inibidores de proteases cOmplete™, *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche), por cada 10mL de sangue recolhido. As amostras foram posteriormente centrifugadas durante um período de 8min, a uma velocidade de 2 500g, para a separação e obtenção das amostras de plasma.

Após a colheita, as amostras foram imediatamente armazenadas a uma temperatura de -80°C, com o objetivo de manter a integridade das proteínas nelas presentes.

## 2.2. Tratamento das Amostras

Na primeira etapa deste projeto, de otimização das amostras, estas foram tratadas com o objetivo de realizar uma depleção das proteínas de maior peso molecular, e abundância relativa, nomeadamente a albumina. A importância desta etapa, prende-se com a possibilidade da presença destas proteínas de maior abundância e peso molecular, poder inviabilizar a deteção de outras proteínas, de menor abundância relativa nas amostras, e de menor peso molecular. Para a realização desta etapa de otimização, foram utilizados diversos métodos, que se encontram abaixo descritos.

### 2.2.1. Adição De Diferentes Percentagens de Dodecil-Sulfato de Sódio (SDS)

Tendo em conta os resultados obtidos por eletroforese SDS-PAGE para as amostras de sangue total, soro e plasma humanos (Fig 2.1), que revelaram a existência de muitas bandas sobrepostas, dificultando a visualização das diferentes proteínas das amostras, foi testada a adição de diferentes percentagens de SDS, um detergente aniónico que atua como agente

desnaturante de proteínas, com o objetivo de obter uma melhor desnaturação das proteínas das amostras, permitindo assim uma melhor visualização dos perfis proteicos dessas mesmas amostras. As amostras utilizadas foram as de sobrenadantes de culturas de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, da estirpe 3D7, com níveis de parasitemia de 20% e 22%. Foram testadas as adições de percentagens de SDS (Panreac) de 0,1%, 0,2%, 0,5% e 1%. Os resultados destas adições foram visualizados através da técnica de electroforese SDS-PAGE, tendo sido realizado um gel de 10% de poliacrilamida, e seguido o procedimento descrito em 2.7.1.

### **2.2.2. Depleção das Proteínas de Maior Abundância e Peso Molecular**

Os resultados obtidos pela adição de SDS permitiram uma melhor visualização dos diferentes perfis proteicos das amostras, mas vieram também confirmar a presença de uma “mancha”, na região de 60 kDa, que corresponde a albumina de soro humano (HSA, do inglês *Human Serum Albumin*). A presença desta proteína, que é a proteína mais abundante do sangue humano, pode impossibilitar a visualização de outras proteínas de menor abundância. Assim sendo, este passo de depleção das proteínas, de maior abundância e peso molecular, é de extrema importância para este projeto.

Para realizar este objetivo, foram testados dois métodos, a utilização de membranas de exclusão molecular com um *cut-off* de 50 kDa, e o *kit* de remoção de albumina *AlbuminOut*, da G-Biosciences. Estes dois métodos foram também testados em simultâneo, e em diferentes ordens. Foi igualmente testada a passagem pelas membranas de exclusão molecular, com um limite de exclusão de 50 kDa, e posterior lavagem da membrana com tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,2.

#### **2.2.2.1. Depleção Das Proteínas de maior Abundância e Peso Molecular, usando Amicons Ultra-0,5, Com Limite De Exclusão Molecular De 50 kDa**

Foram utilizados Amicons Ultra-0.5 50K (Merck Milipore), com membranas que apresentam limite nominal de peso molecular de 50 kDa, com o objetivo de fazer a depleção das proteínas mais abundantes das amostras, e de maior peso molecular, nomeadamente a albumina (~67 kDa).

A sua utilização foi efetuada de acordo com o protocolo descrito e fornecido pela Merck Milipore, como seguidamente descrito. Os Amicons foram previamente lavados, através de centrifugação com H<sub>2</sub>O Milli-Q (3x 500µL, 5min, 14 000g) (Centrífuga Centurion Scientific K3

Series K241R, com o rotor BRK5424 (Centurion Scientific Ltd)), com o objetivo de eliminar possíveis restos de glicerina presentes nas membranas.

Foram inseridos no Amicon 500µL de amostra. As amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 14 000g (2x 10min + 2x 5min) (Centrífuga Centurion Scientific K3 Series K241R, com o rotor BRK5424 (Centurion Scientific Ltd)), e a uma temperatura de 4°C, para a obtenção da amostra filtrada, ou seja, a fração da amostra que contem as proteínas com um peso molecular inferior a 50 kDa. Estas frações foram recolhidas para eppendorfs de 1,5mL.

As frações correspondentes às proteínas com um peso molecular superior a 50 kDa, foram recolhidas através da inversão das colunas nos tubos coletores, e subsequente centrifugação (2min, 1 000g, 4°C) (Centrífuga Centurion Scientific K3 Series K241R, com o rotor BRK5424 (Centurion Scientific Ltd)) , e foram também recolhidas para eppendorfs de 1,5mL.

Posteriormente à sua utilização, os Amicons foram novamente lavados e centrifugados com H<sub>2</sub>O Mili-Q (3x 500µL, 14 000g) (Centrífuga Centurion Scientific K3 Series K241R, com o rotor BRK5424 (Centurion Scientific Ltd)), e os tubos coletores de 2mL fornecidos foram descartados.

Os resultados obtidos foram visualizados através da técnica de eletroforese SDS-PAGE, tendo sido realizado um gel de 10% de poliacrilamida, e seguido o procedimento descrito em 2.7.1.

Para a utilização da mesma quantidade de proteína nos diferentes géis de poliacrilamida, as amostras foram previamente quantificadas, a nível proteico, através do método *Pierce 660nm Protein Assay Kit*, conforme descrito em 2.7.3.

#### **2.2.2.2. Depleção Das Proteínas de Maior Abundância e Peso Molecular, utilizando o kit *AlbuminOut***

Para garantir uma maior remoção de albumina das diferentes amostras, foi utilizado o kit *AlbuminOut* (G-Biosciences). O funcionamento deste kit é baseado na ligação entre a Albumina e o corante *Cibachron Blue*, e foi otimizado pela G-Biosciences para a remoção de Albumina humana. Este sistema foi utilizado de acordo com o protocolo descrito e fornecido pela G-Biosciences, tal como seguidamente apresentado.

Foram preparadas alíquotas de 50µL de amostra, às quais foram adicionados 50µL de *Albumin Binding Buffer* (G-Biosciences). Estas alíquotas foram posteriormente centrifugadas durante 5min, a 10 000g, e a uma temperatura de 4°C (Centrifugação feita em Centrífuga Centurion Scientific K3 Series K241R, com o rotor BRK5424 (Centurion Scientific Ltd)). Após a centrifugação, foram recolhidos os sobrenadantes, e foram armazenados em gelo.

As colunas *AlbuminOut Spin Column*, fornecidas no *kit*, foram levemente agitadas durante 5s, tendo depois sido colocadas em tubos coletores de 2mL.

Para preparar as colunas para a sua utilização, foram inseridos 100µL de *Albumin Binding Buffer*, e foram centrifugadas durante 15s, a uma velocidade de 10 000g, e a uma temperatura de 4°C (Centrifugação feita em Centrífuga Centurion Scientific K3 Series K241R, com o rotor BRK5424 (Centurion Scientific Ltd)). Este processo foi repetido 3 vezes, e após este processo o tubo coletor foi esvaziado, e novamente colocado sob a coluna.

Foram posteriormente inseridos na coluna, os 100µL de sobrenadante previamente preparados, e as colunas foram incubadas num período de 2min, à temperatura ambiente. Após este período, o volume de amostra que passou para o tubo coletor foi novamente inserido na coluna, e as colunas foram novamente incubadas durante 2min, repetindo as condições anteriores.

Após o período de incubação, as colunas foram centrifugadas durante 5s, a 1 000g, a uma temperatura de 4°C (Centrifugação feita em Centrífuga Centurion Scientific K3 Series K241R, com o rotor BRK5424 (Centurion Scientific Ltd).), e o volume que passou pela coluna foi recolhido para eppendorfs de 1,5mL.

Para a lavagem das colunas *AlbuminOut Spin Column*, após a sua utilização, estas foram centrifugadas com 200µL de *Albumin Binding Buffer*, durante 5s, 1 000g, a 4°C (Centrifugação feita em Centrífuga Centurion Scientific K3 Series K241R, com o rotor BRK5424 (Centurion Scientific Ltd)). Este processo foi repetido por 3 vezes. Os tubos coletores foram então esvaziados, e foram posteriormente adicionados nas colunas 100µL de *Albumin Elution Buffer* (G-Biosciences), e foram incubadas durante 5min, à temperatura ambiente. Após o período de incubação, as colunas foram novamente centrifugadas durante 5s, a uma velocidade de 1 000g e temperatura de 4°C (Centrifugação feita em Centrífuga Centurion Scientific K3 Series K241R, com o rotor BRK5424 (Centurion Scientific Ltd)). Os tubos coletores fornecidos foram posteriormente descartados.

Para a utilização da mesma quantidade de proteína nos diferentes géis de poliacrilamida, as amostras foram previamente quantificadas, a nível proteico, através do método *Pierce 660nm Protein Assay Kit*, conforme descrito em 2.7.3.

A utilização dos Amicons Ultra-0.5 50K (Merck Milipore), ou do kit *AlbuminOut* (G-Biosciences), separadamente, não permitiu uma depleção eficiente de albumina das diferentes amostras, tendo sido então seguida a estratégia de utilizar estes dois métodos em conjunto.

#### **2.2.2.3. Depleção Das Proteínas de maior Abundância e Peso Molecular, usando Amicons Ultra-0,5, Com Limite De Exclusão Molecular De 50 kDa, seguido do uso do kit *AlbuminOut***

Foram inseridos 500µL de amostra nas colunas dos Amicons Ultra-0.5 50K (Merck Milipore), e o protocolo seguido foi o descrito e fornecido pela Merck Milipore, tal como descrito em 2.2.2.1.

As frações de amostras obtidas através do sistema Amicons Ultra-0.5 50K (Merck Milipore), que contêm as proteínas com um peso molecular inferior a 50 kDa, foram posteriormente divididas em alíquotas de 50µL.

Estas alíquotas de 50µL de cada amostra foram então passadas pelo kit *AlbuminOut* (G-Biosciences), conforme o protocolo fornecido pela G-Biosciences e apresentado em 2.2.2.2.

As frações de cada amostra foram então recolhidas em conjunto para eppendorfs de 1,5mL.

Após a passagem pelos dois sistemas, o volume total de amostra obtida foi inserido em Amicons Ultra-4 3K (Merck Milipore), que contêm colunas com um limite nominal de pesos moleculares de 3 kDa, com o objetivo de concentrar as diferentes amostras. O protocolo seguido foi o fornecido e descrito pela Merck Milipore.

Previamente à sua utilização, os Amicons Ultra-4 3K (Merck Milipore) foram lavados com 4mL de H<sub>2</sub>O Mili-Q, tendo sido centrifugados durante 10min, a uma velocidade de 4 000g (Centrifugação feita em Centrífuga Centurion Scientific K3 Series K241R, com o rotor BRK5308 (Centurion Scientific Ltd)). Este processo foi repetido duas vezes, e teve como objetivo a eliminação de possíveis resíduos de glicerina, que poderiam interferir com a eficiência dos mesmos e com a posterior análise das amostras.

Após a lavagem dos Amicons Ultra-4 3K (Merck Milipore), foi introduzido nas colunas o volume total de amostra, de cerca de 1,5mL, obtido pela passagem sequencial pelos Amicons Ultra-0.5 50K (Merck Milipore) e pelo kit *AlbuminOut* (G-Biosciences), tendo sido centrifugados, a uma velocidade de 4 000g, e a uma temperatura de 4°C (Centrifugação feita em Centrífuga Centurion Scientific K3 Series K241R, com o rotor BRK5308 (Centurion Scientific Ltd)), durante o período de tempo necessário para a obtenção de um volume final de amostra concentrada de cerca de 250µL.

Para a utilização da mesma quantidade de proteína nos diferentes géis de poliacrilamida, as amostras foram previamente quantificadas, a nível proteico, através do método *Pierce 660nm Protein Assay Kit*, conforme descrito em 2.7.3.

Sendo que foi utilizada a estratégia de utilizar sequencialmente os Amicons Ultra-0.5 50K (Merck Milipore) e o kit *AlbuminOut* (G-Biosciences), foi também seguida a estratégia de utilizar também os mesmos sistemas de forma sequencial, mas invertendo a ordem da sua utilização, ou seja, utilizar primeiramente o kit *AlbuminOut* (G-Biosciences), e de seguida o sistema Amicons Ultra-0.5 50K (Merck Milipore), com o objetivo de avaliar qual das estratégias, com a utilização destes dois métodos, se apresentava mais eficiente na remoção da albumina.

#### **2.2.2.4. Depleção Das Proteínas de maior Abundância e Peso Molecular, usando o kit *AlbuminOut*, seguido do uso de Amicons Ultra-0,5, Com Limite De Exclusão Molecular De 50 kDa**

Sendo que foi utilizada a estratégia de utilizar sequencialmente os Amicons Ultra-0.5 50K (Merck Milipore) e o kit *AlbuminOut* (G-Biosciences), foi também seguida a estratégia de utilizar também os mesmos sistemas de forma sequencial, mas invertendo a ordem da sua utilização, ou seja, utilizar primeiramente o kit *AlbuminOut* (G-Biosciences), e de seguida o sistema Amicons Ultra-0.5 50K (Merck Milipore).

Assim sendo, foram utilizados volumes iniciais de cada amostra de 500µL, assim como na estratégia anteriormente referida 2.2.2.3. O volume de amostra foi dividido em alíquotas de 50µL tendo estes sido posteriormente passados pelo kit *AlbuminOut* (G-Biosciences), de acordo com o protocolo fornecido pela G-Biosciences e anteriormente descrito em 2.2.2.2.

O volume total de cada amostra, obtido pela utilização do kit *AlbuminOut* (G-Biosciences), foi passado pelo sistema Amicons Ultra-0.5 50K (Merck Milipore), de acordo com o protocolo fornecido pela Merck Milipore, e previamente descrito em 2.2.2.1.

As frações de cada amostra foram então recolhidas em conjunto para eppendorfs de 1,5mL.

Tal como na estratégia anteriormente referida em 2.2.2.3, posteriormente à passagem das diferentes amostras pelos dois sistemas, o volume total de amostra obtido foi inserido em Amicons Ultra-4 3K (Merck Milipore), cujas colunas apresentam um limite nominal de pesos moleculares de 3 kDa, para proceder à concentração das diferentes amostras. O protocolo seguido foi o fornecido e descrito pela Merck Milipore.

Previamente à sua utilização, os Amicons Ultra-4 3K (Merck Milipore) foram lavados com 4mL de H<sub>2</sub>O Mili-Q, tendo sido centrifugados durante 10min, a uma velocidade de 4 000g (Centrifugação feita em Centrífuga Centurion Scientific K3 Series K241R, com o rotor BRK5308 (Centurion Scientific Ltd)). Este processo foi repetido duas vezes. Após a lavagem dos Amicons Ultra-4 3K (Merck Milipore), foi introduzido nas colunas o volume total de amostra obtido pela passagem sequencial pelos Amicons Ultra-0.5 50K (Merck Milipore) e pelo kit *AlbuminOut* (G-Biosciences), tendo sido centrifugados, a uma velocidade de 4 000g, e a uma temperatura de 4°C (Centrifugação feita em Centrífuga Centurion Scientific K3 Series K241R, com o rotor BRK5308 (Centurion Scientific Ltd)), durante o período de tempo necessário para a obtenção de um volume final de amostra concentrada de cerca de 250µL.

Para a utilização da mesma quantidade de proteína nos diferentes géis de poliacrilamida, as amostras foram previamente quantificadas, a nível proteico, através do método *Pierce 660nm Protein Assay Kit*, conforme descrito em 2.7.3.



Com o objetivo de aumentar a quantidade de proteína das amostras recuperada dado que esta era bastante diminuta, e se apresentava maioritariamente como albumina, as amostras foram novamente sujeitas à sua utilização com o método Amicon Ultra-0,5 50K (Merck Milipore), mas, com a finalidade de aumentar a quantidade de proteína das amostras recuperada, foi efetuada a lavagem da coluna, após a recolha da fração da amostra que contem as proteínas de peso molecular inferior a 50 kDa, usando a solução tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7,2.

#### **2.2.2.5. Depleção Das Proteínas de maior Abundância e Peso Molecular, usando Amicons Ultra-0,5, Com Limite De Exclusão Molecular De 50 kDa, com Lavagem com solução Tampão Fosfato de Sódio 5mM, pH 7,2**

Esta lavagem foi feita com tampão fosfato de sódio, com uma concentração de 5mM e um pH de 7,2. A utilização desta solução de tampão fosfato de sódio está relacionada com o facto de a concentração iónica e osmolaridade deste tampão serem equiparáveis às condições fisiológicas.

Os Amicons Ultra-0,5 50K foram utilizados, com um volume inicial de amostra de 500µL, de acordo com o protocolo fornecido pela Merck Milipore e acima referido em 2.2.2.1.

Após a realização das centrifugações necessárias para a obtenção da fração correspondente às proteínas com um peso molecular de 50 kDa, as colunas foram lavadas com 400µL de PBS 5mM pH 7,2, e foram centrifugadas durante 10min, a uma velocidade de 14 000g, e a uma temperatura de 4°C (Centrifugação feita em Centrífuga Centurion Scientific K3 Series K241R, com o rotor BRK5424 (Centurion Scientific Ltd)). Este processo foi efetuado duas vezes, para cada amostra.

Para a utilização da mesma quantidade de proteína nos diferentes géis de poliacrilamida, as amostras foram previamente quantificadas, a nível proteico, através do método *Pierce 660nm Protein Assay Kit*, conforme descrito em 2.7.3.

Após definidas as melhores condições de tratamento das amostras, com o objetivo de remover das amostras as proteínas de maior abundância, e peso molecular, nomeadamente albumina, que são as da passagem das amostras por Amicons Ultra-0.5 50K (Merck Milipore), seguida da lavagem das colunas com 2 volumes de 400µL de PBS 5mM pH 7,2, as amostras obtidas, foram armazenadas a uma temperatura de -80°C, para preservar a integridade do conteúdo proteico das amostras, tendo em vista a realização da técnica de eletroforese bidimensional (2DE), que foi posteriormente realizada.

## **2.3. Eletroforese Bidimensional**

A eletroforese bidimensional é uma técnica que permite a separação das proteínas em duas dimensões distintas. A focagem isoelétrica, ou 1ª dimensão, permite a separação das proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico, que é o valor de pH que uma determinada proteína apresenta uma carga total igual a zero. A 2ª dimensão, realizada pela utilização do método de eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE), permite a separação das proteínas de acordo com a sua massa molecular. Para a realização desta técnica, e subsequente análise dos resultados, foram utilizadas as amostras de soro humano, de um indivíduo saudável, um indivíduo saudável, com historial clínico de malária, e um indivíduo infetado com malária aguda de *P. falciparum*.

### **2.3.1. Preparação Das Amostras Para Electroforese Bidimensional – 2D Clean Up Kit**

A eficiência da análise de eletroforese bidimensional de uma amostra é afetada pela presença de impurezas, incluindo sais, detergentes iónicos, lípidos, compostos fenólicos ou ácidos nucleicos, sendo assim de extrema importância a sua remoção das amostras previamente à sua utilização para este método de análise. Um método eficaz, e de fácil execução, é a precipitação das proteínas das amostras, permitindo a sua separação dos outros componentes das mesmas.

Para realizar a eliminação destes contaminantes, através da precipitação das proteínas, foi utilizado o kit *2D Clean Up Kit*, GE Healthcare. A utilização deste método permite não só a eliminação dos contaminantes das amostras, mas também a sua concentração. Este *kit* foi este executado de acordo com o protocolo descrito e fornecido pela GE Healthcare, com pequenas alterações.

Tendo em conta a elevada suscetibilidade da técnica de eletroforese bidimensional a agentes contaminantes, todo o material utilizado na sua execução foi mantido e manuseado com os cuidados necessários para limitar a introdução de contaminantes, tendo em conta a realização da técnica e a análise proteómica subsequente.

Conforme o protocolo fornecido com o kit, o volume de amostra de 200µL foi inserido em eppendorfs de 1,5mL. Foram então adicionados, por cada 100µL de amostra, 300µL de solução precipitante, fornecida no kit. As amostras foram então agitadas com o recurso a um vórtex, e foram de seguida incubadas em gelo, durante um período de 15min.

Após o período de incubação, foram adicionados 300µL de solução co precipitante, por cada 100µL de amostra inseridos inicialmente. Esta solução foi igualmente fornecida pelo *kit*

*2D Clean Up Kit*, GE Healthcare. De seguida, as amostras foram agitadas, com o recurso a um vórtex.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante um período de 5min, a uma velocidade de 12 000g, e imediatamente após a centrifugação, foram recolhidos e descartados os sobrenadantes das amostras, através da inversão dos eppendorfs. As amostras foram novamente centrifugadas, com um *spin-down*, e o restante sobrenadante foi cuidadosamente retirado com o auxílio de uma micropipeta, tendo sido mantido todo o sedimento originado, que contem as proteínas da amostra.

Foram então adicionados 40μL de solução co precipitante, por cada 100μL de amostra inicialmente introduzida, e as amostras foram incubadas, em gelo, durante um período de 5min. De seguida as amostras foram novamente centrifugadas a uma velocidade de 12 000g, durante um período de 5min, tendo sido posteriormente o sobrenadante retirado, com o auxílio de uma micropipeta, e descartado.

Foram, seguidamente, adicionados 40μL de H<sub>2</sub>O ultra pura ao sedimento, e este foi dispersado com auxílio de uma ponta de micropipeta.

Posteriormente foram adicionados 1000 μL de solução de lavagem, por cada 100μL de amostra inicialmente inserida. A solução de lavagem, fornecida pela GE Healthcare no kit, foi armazenada a uma temperatura de -20°C, pelo menos 1 hora antes da realização deste procedimento, conforme especificado no protocolo fornecido. Esta solução tem como objectivo a remoção de contaminantes não-proteicos que se possam ainda encontrar nas amostras.

Foram também adicionados, a cada amostra, 8μL de solução *Wash Addictive*, sendo que a utilização desta solução visa a rápida e completa ressuspensão das proteínas presentes das amostras.

As amostras obtidas foram posteriormente incubadas a uma temperatura de -20°C durante cerca de 18 horas, e foram periodicamente agitadas em vórtex, durante 20s, para assegurar a completa solubilização de todas as proteínas das amostras.

Após este período de incubação, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 12 000g, durante um período de 5min, e de seguida o sobrenadante foi removido e descartado, e o sedimento foi deixado a secar ao ar, brevemente.

Ao sedimento foi então adicionado um volume de 120μL tampão de focagem (7M Ureia; 2M Tiourea; 2% CHAPS; 0,1% DTT; 100mM PMSF), e as amostras foram incubadas no tampão de focagem durante um período de cerca de 24 horas, até à sua utilização para a etapa de focagem isoeletrica.

### **2.3.2. Focagem Isoelétrica Das Amostras – 1ª Dimensão Da Eletroforese Bidimensional**

As amostras foram primeiramente centrifugadas, a uma velocidade de 10 000g, durante um período de 10min. Os sobrenadantes foram transferidos para um novo eppendorf e os sedimentos descartados.

De seguida, foi realizada uma etapa de quantificação de proteínas, pelo método Pierce 660nm Protein Assay, Thermo Scientific, de acordo com o protocolo fornecido e descrito em 2.7.3.

Através da reta de calibração construída através do valor de referência, para o qual foi utilizada H<sub>2</sub>O Mili-Q, e dos padrões de BSA de 125, 250, 500, 750 e 1000µg/mL (Thermo Scientific), foram calculadas as concentrações de proteínas das diferentes amostras. Foram calculados os volumes de amostra necessários para que fossem obtidos 200µg de proteína para cada amostra.

As tiras Immobiline DryStrip 7cm pH 3-10 NL, GE Healthcare, utilizadas para focagem isoeétrica com um gradiente de pH entre 3-10, não linear, reidratadas em solução de reidratação (7M Ureia; 2M Tioureia; 2% CHAPS; 0,1% DTT; 100mM PMSF; 0,5% Destreak; 0,5% Anfólitos Transportadores) que continha também as proteínas de cada amostra, tendo sido utilizados 200µg de proteína, quantificada através do método descrito em 2.7.3. O reagente Destreak e os Anfólitos transportadores foram apenas inseridos imediatamente antes da reidratação das tiras. O volume de solução de reidratação foi uniformemente espalhado em suportes de tiras IPG 7cm Strip Holder, GE Healthcare. As tiras Immobiline DryStrip 7cm pH 3-10 NL, GE Healthcare, foram colocadas por cima da amostra, com cuidado, para que não se formassem bolhas entre as tiras de gradientes de pH imobilizados e as amostras. O suporte IPG 7cm Strip Holder, GE Healthcare, foi selado com 750µL de DryStrip Cover Fluid, GE Healthcare, e foram colocadas as respetivas tampas. Todos os reagentes acima referidos, e utilizados para a etapa de focagem isoeétrica, foram obtidos através da GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido.

Posteriormente, os suportes de tiras foram dispostos no sistema Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing System, GE Healthcare, com especial atenção para a posição correta do ânodo e cátodo. A focagem isoeétrica foi realizada durante 17 horas e 30min, de acordo com o programa que pode ser consultado na tabela 2.3.

**Tabela 2.3.** Programa de focagem isoeletrica utilizado, com o auxílio do sistema *Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing System* (GE Healthcare).

Passo	Voltagem	Duração	V/h	Modo de Voltagem	Temperatura(°C)
1	30	15h	-	<i>Step and Hold</i>	
2	100	30min	50	Gradiente	
3	500	30min	250	Gradiente	20
4	1000	30min	500	Gradiente	
5	5000	60min	5000	<i>Step and Hold</i>	

### 2.3.3. Eletroforese Em Gel de Poliacrilamida, Em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE) – 2ª Dimensão da Eletroforese Bidimensional

Finalizado o programa estabelecido para a realização da focagem isoeletrica, as tiras *Immobiline DryStrip 7cm pH 3-10 NL*, GE Healthcare, foram removidas dos respectivos suportes, e foram inseridas, primeiramente, numa solução de tampão de equilíbrio (75mM Tris-HCl pH 8,8; 6M Ureia (GE Healthcare); 29,3% (v/v) Glicerol (GE Healthcare); 2%(p/v) SDS (GE Healthcare); 0,002% (p/v) Azul de Bromofenol (GE Healthcare), suplementada com uma solução de 1% (p/v) de DTT (GE Healthcare). As tiras permaneceram nesta solução durante um período de incubação de 15min, com agitação, e à temperatura ambiente. De seguida as tiras foram retiradas da solução e foram inseridas novamente numa outra solução de tampão de equilíbrio, sendo que este foi suplementado com uma solução de 2,5% (p/v) de iodoacetamida (GE Healthcare), em vez de DTT. Novamente, as tiras foram deixadas nesta solução durante um período de 15min, com agitação, e à temperatura ambiente.

Para a realização da eletroforese SDS-PAGE, foram preparados géis de resolução de 10% de poliacrilamida, com uma espessura de 1mm, contendo (4,2mL H<sub>2</sub>O Mili-Q; 3mL de 4X Tris-HCl pH 8,8; 4,8mL 40% Acrilamida / Bisacrilamida (37,5:1) (Bio-Rad); 90µL APS (Sigma); 12µL TEMED (Bio-Rad)), e foi deixado no suporte, selado com H<sub>2</sub>O Mili-Q, à temperatura ambiente, durante um período de 30min, para permitir a polimerização do gel, e após o tempo de espera, a água foi retirada, através da inversão dos géis. Após a inserção de 4µL do marcador de pesos moleculares *NZYColour Protein Marker II* (11-245 kDa) (NZYTech), foram inseridas as tiras *Immobiline DryStrip 7cm pH 3-10 NL* (GE Healthcare), provenientes da etapa de focagem isoeletrica, e estas foram adicionadas no topo do gel de poliacrilamida, tendo sido esta operação feita com extremo cuidado para que não houvesse formação de bolhas de ar entre a tira e o gel, o que poderia levar a uma migração diferencial das proteínas. Os géis foram montados num sistema Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad).

Por último, os géis de poliacrilamida foram selados com uma solução de 0,5% Agarose (GE Healthcare), tampão catódico, e Azul de Bromofenol.

Foram preparadas as soluções de tampão anódico e catódico (0,25% (v/v) e 0,5% (v/v) de SDS, respetivamente), respetivamente, tendo sido o tampão anódico inserido na tina de eletroforese, e o tampão catódico inserido dentro da cassette de suporte dos géis.

As amostras foram corridas com o auxílio de uma fonte de alimentação PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad), em que foi definida inicialmente uma voltagem de 30V, durante um período de cerca de 60min, para permitir a passagem das proteínas das tiras de gradiente de pH imobilizado para o gel de poliacrilamida. Após este período, foi definida uma voltagem de 100V, e o gel foi corrido nestas condições durante aproximadamente 60min.

Após a realização da eletroforese SDS-PAGE, os géis foram inicialmente lavados com H<sub>2</sub>O Mili-Q, e foram posteriormente corados com uma solução de Azul de Coomassie R-350, durante um período de 30min, a uma temperatura de 57°C, sem agitação. A remoção da solução de Azul de Coomassie R-350 em excesso, foi realizada através de várias lavagens com H<sub>2</sub>O Mili-Q, a uma temperatura de 57°C. .

As imagens dos géis obtidos por eletroforese bidimensional foram adquiridas com recurso a um scanner *ImageScanner II*, da GE Healthcare, e a calibração das imagens foi previamente inserida, de modo automático, pelo software de obtenção de imagem. As imagens foram obtidas com uma resolução de 300dpi, valor superior ao de resolução mínima recomendada para permitir a análise dos padrões de proteínas das diferentes amostras.

#### **2.4. Análise Dos Padrões De Spots De Proteínas, Obtidos pela técnica de Eletroforese Bidimensional, através do Software *Melanie 7.0*, *GeneBio***

A análise dos padrões de *spots*, em que cada spot corresponde a uma proteína, das diferentes amostras foi realizada com o software *Melanie 7.0*, GeneBio. A resolução das imagens obtidas foi de 300dpi, e a calibração das mesmas foi efetuada pelo software do *ImageScanner II*, da GE Healthcare, sendo esta calibração automaticamente guardada nos ficheiros e transmitida para as imagens convertidas para o tipo de ficheiro utilizado para a sua análise com o *Melanie 7.0*.

Os diferentes spots foram detetados de forma automática pelo software, de acordo com os seguintes parâmetros: um valor de *Smooth* de 3, parâmetro indicativo do número de vezes que o software aplica um algoritmo para suavizar cada *spot* antes da sua deteção. Este parâmetro é principalmente utilizado para dividir *spots* que apareçam sobrepostos. Foi definido um valor de *Saliency* de 2, sendo que este parâmetro é indicativo da distância a que cada *spot* aparece

desviado do seu *background*. Este valor foi definido através do valor de saliência de spots que foram suprimidos da análise das imagens e, geralmente, *spots* considerados reais, ou seja, correspondentes a proteínas, apresentam elevados valores deste parâmetro. O terceiro parâmetro definido foi o de *Min Area*, de 10, valor este indicativo do valor de área mínima de cada *spot*, tendo sido suprimidos todos os *spots* com valores inferiores ao indicado. Este parâmetro é principalmente utilizado para suprimir artefactos, como partículas de pó.

Os *spots* que correspondiam claramente a ruído, artefactos, proteínas claramente saturadas, assim como ao marcador de pesos moleculares, foram manualmente eliminados. Os *spots* correspondentes as proteínas com um peso molecular superior a 50kDa foram também excluídos da análise, dado que não é possível calcular com exatidão a quantidade destas proteínas nas amostras.

A correspondência entre os diferentes *spots* de cada amostra foi realizado de forma manual, tendo sido analisado cada *spot*, e possíveis correspondências. As correspondências entre as amostras em análise foram assinaladas com o recurso a *landmarks*. As diferentes correspondências foram analisadas de acordo com o volume de cada *spot*. Os *spots* proteicos, que foram identificados e correspondidos nas diferentes amostras, foram analisados através do cálculo do rácio entre o valor de volume de um determinado *spot*, e o valor de volume do *spot* proteico correspondente na amostra definida como controlo, ou seja, a amostra de soro humano de um indivíduo saudável. Valores de rácios inferiores a 0,7, ou superiores a 1,5 foram considerados como indicativo de variações significativas nos níveis de expressão dessas mesmas proteínas nas diferentes amostras.

## **2.5. Análise Dos Spots de Interesse – Análise Por Espectrometria De Massa (MALDI-TOF/TOF MS/MS)**

Os *spots* de maior interesse, ou seja, que foram visualizados na amostra do indivíduo infetado com malária aguda de *P. falciparum*, que aparentavam apresentar variações de abundância entre a amostra de um indivíduo saudável e a amostra de um indivíduo infetado com malária aguda, assim como *spots* de proteínas cujos níveis de expressão tenham apresentado uma variação significativa, foram selecionados através da comparação entre os diferentes padrões de proteínas das amostras, através da comparação visual entre os diferentes géis obtidos por eletroforese bidimensional e da análise de padrões de *spots* de proteínas, com o recurso ao software *Melanie 7.0*, GeneBio. Os *spots* de interesse foram excisados, e posteriormente enviados para análise por espectrometria de massa.

Foram selecionados 43 *spots*, que foram analisados pelo Dr. Hugo Osório, no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP).

Para a realização da análise por espectrometria de massa, as amostras foram inicialmente reduzidas, com a utilização de uma solução de 25mM de DTT, e alquiladas, com a utilização de uma solução de 55mM de iodoacetamida, conforme o protocolo descrito pelo Dr. Hugo Osório (Osório *et al*, 2013). Posteriormente, foi feita a sua digestão enzimática, com o recurso a um gel com tripsina. As amostras passaram ainda por uma etapa de purificação peptídica, que foi realizada através da utilização de pontas ZipTip C18.

Foram adquiridos os espectros de massa de cada amostra, para a janela de  $m/z$  700 –  $m/z$  5000. Seguidamente, foi efetuada a aquisição por MS/MS (*Tandem Mass Spectrometry*) dos 25 picos mais intensos de cada amostra. As amostras foram ionizadas, em ambos os métodos de MS, em modo refletor positivo. Estas análises foram realizadas num aparelho MALDI-TOF/TOF 4800 Plus (SCIEX).

## **2.6. Identificação Das Proteínas Analisadas Por Espectrometria De Massa (MALDI-TOF/TOF MS/MS) – Peptide Mass Fingerprint**

A identificação das proteínas analisadas por espectrometria de massa foi igualmente realizada pelo Dr. Hugo Osório, no IPATIMUP. Esta identificação foi realizada através do método de *Peptide Mass Fingerprint*, por comparação entre os resultados obtidos por MS com a base de dados de sequências da UniProt, tendo os resultados sido comparados com as bases de dados de *Homo sapiens* e de *Plasmodium falciparum*.

Esta identificação foi realizada com uma tolerância para a massa peptídica de  $\pm 20$  ppm, e uma tolerância para a massa de fragmentos de  $\pm 0,5$  Da.

## **2.7. Técnicas Gerais**

### **2.7.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)**

Para a realização desta técnica, é necessário um gel de resolução e um gel de separação, que diferem entre si pela percentagem de poliacrilamida que contêm. Neste projeto foram utilizados géis de 5% de poliacrilamida, e de 10%, respetivamente. As constituições dos géis de poliacrilamida podem ser consultados no Anexo 1. Ambos os géis foram criados com uma espessura de 0,75mm.

Todo o material necessário para a obtenção dos géis, como os vidros, suportes, cassetes de montagem e pentes formadores de poços, pertence ao sistema de eletroforese Mini-PROTEAN® Tetra (Bio-Rad).



Ao volume de cada amostra pretendido para introdução no gel, foi adicionado um volume de tampão de amostra (20% v/v Glicerol (Sigma); 10mM Mercaptoetanol; 10% p/v SDS (Panreac), 0,5M Tris-HCl pH 6,8; 0,05% p/v Azul de Bromofenol, num volume total máximo de 30µL, para géis em que foram criados 10 poços, e com um volume total máximo de 70µL, para géis em que foram criados 5 poços.

Após a adição de tampão de amostra, as amostras foram aquecidas durante um período de 4min, a uma temperatura de 100°C, num banho de água, para promover e assegurar a desnaturação das proteínas, assim como a quebra de ligações polares e interações de *Van der Waals*.

Para a eletroforese foi utilizado um sistema Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Os géis foram montados nos suportes, e foi adicionado tampão de corrida (1,92M Glicina (Sigma); 0,25M Tris (Carlo Erba); 1% p/v SDS, *Panreac*), diluído, com H<sub>2</sub>O Mili-Q, na razão de 1:10, antes da sua adição. O tampão de corrida foi adicionado na tina de eletroforese, até ao volume necessário, de acordo com o número de géis que estava a ser corrido, e dentro das cassetes de montagem num volume necessário para que este cobrisse completamente todos os poços dos géis.

As amostras foram então depositadas nos poços correspondentes, assim como o marcador de pesos moleculares. Foram utilizados dois marcadores de pesos moleculares, um de baixos pesos moleculares, *Unstained SDS-PAGE Standard Low Range* (14,4 – 97,4 kDa) da Bio-Rad, e um marcador de pesos moleculares de largo espectro *NZYColour Protein Marker II* (11-245 kDa), da NZY Tech. O marcador de pesos moleculares foi adicionado num volume de 3µL.

As amostras foram corridas com o auxílio de uma fonte de alimentação PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad), com uma voltagem constante de 150V, amperagem variável, e num período de tempo necessário as proteínas de menor peso molecular corressem até ao fim do gel.

Após a etapa de eletroforese, as amostras imersas numa solução corante (0,5% p/v Azul de Coomassie R-250 (Sigma); 7,5% (v/v) Ácido Acético (Carlo Erba); 45% (v/v) Metanol (LabChem)), durante um período de 30min, com agitação. Após este período de tempo, o corante em excesso nos géis foi removido com uma solução descolorante (7,5% (v/v) Ácido Acético (Carlo Erba); 45% (v/v) Metanol (LabChem)), durante o tempo necessário para a obtenção dos resultados pretendidos.

### **2.7.2. Coloração De Géis De Poliacrilamida Com Nitrato De Prata (AgNO<sub>3</sub>) - *PlusOne Silver Staining Kit***

O *kit* PlusOne Silver Staining, da GE Healthcare, foi utilizado para a coloração de géis de poliacrilamida, sendo este método bastante útil para amostras com baixa quantidade de proteínas, dado que a coloração com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) apresenta uma sensibilidade muito superior ao método de coloração com azul de Coomassie, sendo possível a deteção de quantidades de proteína inferiores a 1ng (Weiss *et al*, 2009).

Este kit é baseado na metodologia apresentada por Heukeshoven e Dernick (Heukeshoven *et al*, 1985).

O kit foi utilizado de acordo com o protocolo fornecido e descrito pela GE Healthcare, para géis de poliacrilamida convencionais com 1mm de espessura, tendo sido feitas pequenas alterações. A utilização de géis de 1mm, ao invés de todos os outros géis para eletroforese SDS-PAGE com coloração por Azul de Coomassie, de 0,75mm de espessura, foi devido ao facto de a utilização deste método fragilizar bastante os géis de poliacrilamida.

Após a realização dos géis de eletroforese SDS-PAGE, de acordo com o protocolo descrito em 2.7.1, o gel foi imerso numa solução de fixação (30% (v/v) Etanol (GE Healthcare); 10% (v/v) Ácido Acético (GE Healthcare)) e foi incubado, à temperatura ambiente, durante a noite. No final do período de incubação, foram feitas 3 lavagens, cada uma com um período de incubação de 10min, à temperatura ambiente, e com agitação, tendo a primeira lavagem sido efetuada com uma solução de 30% Etanol (GE Healthcaere), e as duas lavagens subsequentes realizadas com H<sub>2</sub>O Mili-Q.

Após as lavagens, os géis foram incubados durante 1min, numa solução de sensibilização (0,02% (p/v) Tiosulfato de Sódio (GE Healthcare); 6,8% (p/v) Acetato de Sódio (GE Healthcare); 0,0003% (p/v) Glutaraldeído (GE Healthcare)), à temperatura ambiente. De seguida, foi removida a solução de sensibilização, e foram efetuadas 3 lavagens com H<sub>2</sub>O Mili-Q, com períodos de incubação de 10min, à temperatura ambiente, e com agitação.

Posteriormente, os géis foram colocados numa solução de coloração (0,15% (p/v) Nitrato de Prata (GE Healthcare)) e foram deixados, em agitação, a incubar à temperatura ambiente durante um período de 30min. Após o período de incubação, foi descartada a solução de coloração e os géis foram lavados, durante 30s, com H<sub>2</sub>O Mili-Q.

Finalmente, os géis foram colocados numa solução de desenvolvimento (3% (p/v) Carbonato de Sódio (GE Healthcare); 0,05% (p/v) Formaldeído (GE Healthcare)) até ter sido atingido o nível de coloração pretendido, correspondente à saturação das proteínas mais abundantes, e visualização das proteínas de menor abundância das amostras. Quando este nível pretendido foi obtido, os géis foram colocados numa solução de paragem (5% (v/v) Ácido Acético (GE Healthcare)), e foram deixados nesta solução.

Neste projeto, foi utilizada esta técnica para verificar diferenças entre utilização dos métodos de depleção das proteínas mais abundante, e de maior peso molecular, utilizados conjuntamente, e por diferentes ordens, como referido em 2.2.2.4 e 2.2.2.5. Foram inseridas no gel as quantidades de proteína de 0,5µg e 1,0µg. As amostras foram quantificadas através do método *Pierce 660nm Protein Assay Kit* (ThermoScientific), tal como descrito em 2.7.3.

### **2.7.3. Quantificação De Proteínas Das Amostras – *Pierce 660nm Protein Assay Kit***

Para realizar a quantificação de proteínas das diferentes amostras, foi utilizado o kit *Pierce™ 660nm Protein Assay Kit*, da Thermo Scientific. Este método de quantificação de proteínas é baseado na ligação de um complexo metálico corante a proteínas, sendo que a ocorrência desta ligação é possível de observar pela mudança de cor, de castanho avermelhado, para verde, sendo o aumento da cor diretamente proporcional ao aumento da quantidade de proteína das amostras. Este método é ainda compatível com a utilização de detergentes e de agentes redutores, permitindo, com a utilização de microplacas, a quantificação de proteínas no intervalo de 50-2000µg/mL. Este kit foi utilizado de acordo com protocolo descrito e fornecido pela Thermo Scientific, para a utilização de microplacas.

Foram usadas microplacas de 96 poços, nas quais foram inseridos, em poços diferentes, pela ordem descrita, 10µL de cada solução. O primeiro poço corresponde ao branco da experiência, tendo sido para este efeito utilizada H<sub>2</sub>O Mili-Q. Nos 5 poços adjacentes foram inseridos, pela ordem referida, padrões de Albumina de Soro Bovino (BSA) com as seguintes concentrações: 125µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 750µg/mL e 1 000µg/mL, fornecidos pelo kit *Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set*, Thermo Scientific. Através destes padrões, e da amostra de referência, é traçada a reta de calibração pela qual vão ser calculadas as quantidades de proteínas presentes em cada amostra que foi analisada. A curva de calibração através da qual foram calculadas as diferentes quantidades de proteína das amostras é apresentada no Anexo 2.

Após a inserção de 10µL das diferentes soluções e amostras a ser analisadas, foi adicionado, a cada poço, um volume de 150µL de *Protein Assay Reagent* (Thermo Scientific). De seguida, foi colocada a tampa das microplacas, e esta foi incubada à temperatura ambiente, durante um período de 5min.

Imediatamente após o período de incubação, foi medida a absorvância a 660nm de cada amostra, com o auxílio de um leitor de microplacas.

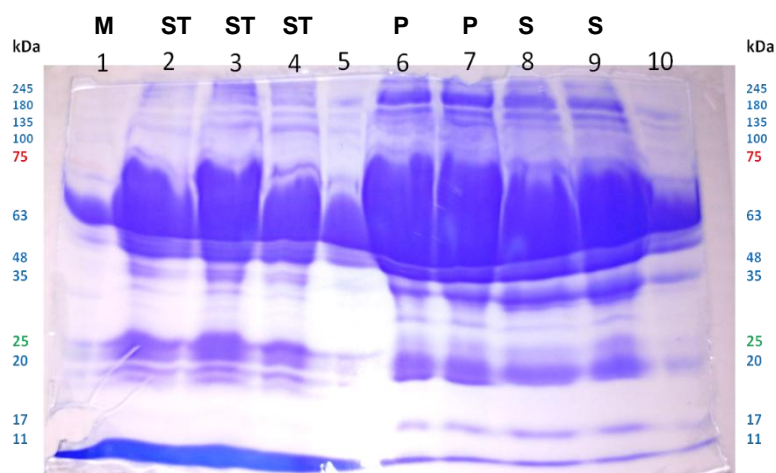


### **3.Resultados e Discussão**



### 3.1. Tratamento das Amostras

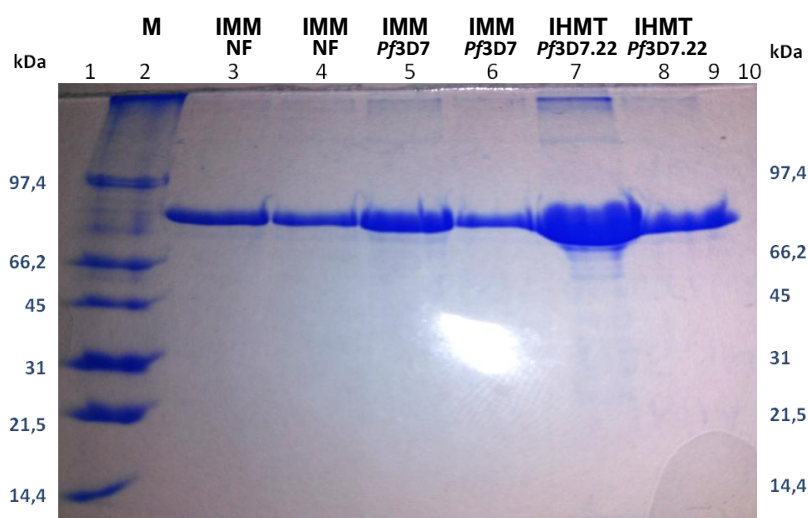
Previamente à utilização das amostras de sobrenadantes de culturas não infectadas e infectadas por *P. falciparum*, foi realizada a técnica de eletroforese SDS-PAGE, com amostras de sangue total, soro e plasma humanos, para visualizar o impacto das proteínas de maior abundância e peso molecular, nomeadamente albumina, nos perfis proteicos das diferentes amostras. Na figura 3.1 encontra-se uma imagem de um gel de poliacrilamida, obtida pela técnica de Eletroforese SDS-PAGE, que contém amostras de sangue total, soro e plasma humano, previamente à realização da otimização pretendida das amostras.



**Figura 3.1.** Gel de eletroforese SDS-PAGE (10% Poliacrilamida / 150V/ 135min) – As amostras inseridas nos diferentes poços são as seguintes: 1. 3µL Marcador de pesos moleculares NZY Tech Protein Colour Marker II (11-245kDa); 2. 3µL Sangue Total; 3. 2µL Sangue Total; 4. 1,5µL Sangue Total; 6. 3µL Plasma; 7. 2µL Plasma; 8. 3µL Soro; 9. 1,5µL Soro; A legenda da figura é feita por: M – marcador; ST – sangue total; P – Plasma; S – Soro;

#### 3.1.1. Sobrenadantes de Culturas de Eritrócitos, cedidas pelo IMM e IHMT

Como referido anteriormente, no ponto 2.1, a primeira etapa deste projeto teve como objetivo a realização da depleção das proteínas de maior peso molecular, e abundância relativa, nomeadamente a albumina, das diferentes amostras. Previamente a esta etapa, com a finalidade de visualizar os diferentes perfis proteicos das amostras de sobrenadantes de culturas de eritrócitos utilizadas neste projeto, foi realizado gel de 10% de poliacrilamida, e os resultados foram obtidos através de eletroforese SDS-PAGE. O gel resultante pode ser observado na figura 3.2.



**Figura 3.2.** Gel SDS-PAGE (10% Poliacrilamida / 150V/ 61min) – 2. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 3. 1µL Sobrenadante de cultura de eritrócitos não infectados (IMM); 4. 0,5µL Sobrenadante de cultura de eritrócitos não infectados (IMM); ; 5. 1µL Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 10% (IMM); 6. 0,5µL Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 10% (IMM); 7. 1µL IHMT Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 22% (IHMT); 8. 0,5µL Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 22% (IHMT); IMM NF – Sobrenadante de cultura de eritrócitos não infectados (IMM); IMM *Pf3D7* – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 10% (IMM); IHMT *Pf3D7.22* – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, das estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 22% (IHMT);

Pela análise dos resultados obtidos, ainda que não tenha sido realizada nenhuma etapa de quantificação proteica das amostras, podemos concluir que a quantidade de proteína presente no gel é extremamente reduzida. Apesar da reduzida quantidade de proteína de cada amostra, é possível afirmar que as amostras contêm bastante albumina de soro humano, sendo esta confirmada pela presença de uma banda de grande intensidade no gel, na região de cerca de 75 kDa. O desvio apresentado, dado que a albumina apresenta um peso molecular de cerca de 67 kDa, pode ser resultante de uma insuficiente desnaturação das proteínas das amostras inseridas.

A reduzida quantidade de proteína das amostras não permite tirar conclusões acerca de possíveis diferenças entre os perfis proteicos das amostras.

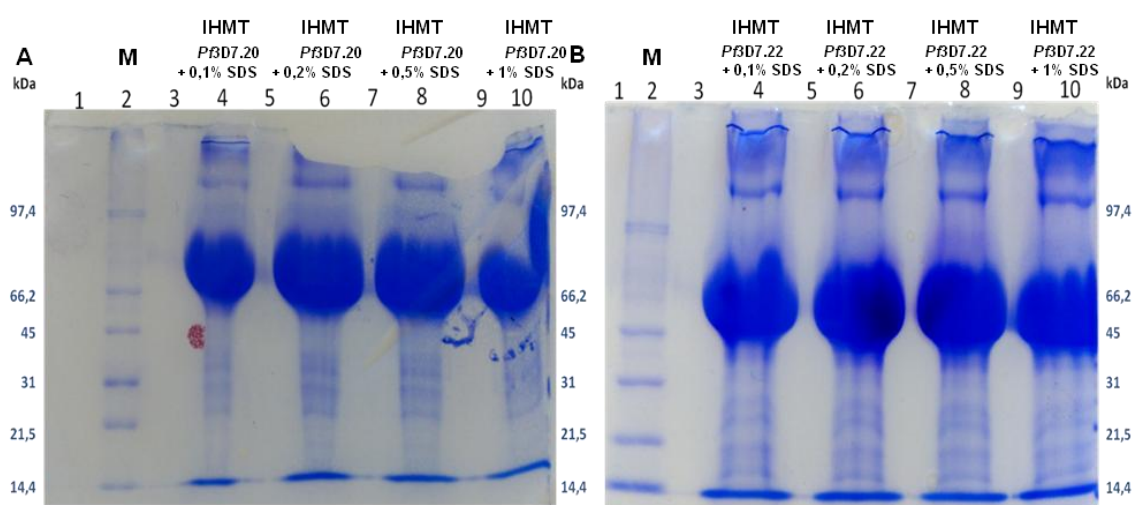
#### 3.1.1.1. Adição De Diferentes Percentagens de Dodecil-Sulfato de Sódio (SDS)

Tendo em conta os resultados inicialmente obtidos, pela técnica de eletroforese SDS-PAGE, e apresentados na figura 3.1, foi testada a adição de diferentes percentagens de SDS



(0,1%; 0,2%; 0,5%; 1%), para tentar obter uma melhor separação das diferentes proteínas das amostras de sobrenadantes de culturas de eritrócitos, sendo que para além da quantidade reduzida de proteína inserida de cada amostra, o nível de desnaturação das mesmas aparentava ser incompleto, podendo algumas proteínas estarem ligadas à albumina, impossibilitando a sua visualização.

Os resultados obtidos pela adição das diferentes percentagens de SDS às diferentes amostras de sobrenadantes de cultura de eritrócitos infetados cedidas pelo IHMT, com níveis de parasitemia de 20% e 22%, foram confirmados por eletroforese SDS-PAGE, e o gel de poliácridamida obtido pode ser consultado na figura 3.3.



**Figura 3.3.** Géis SDS-PAGE (10% Poliácridamida / 150V/ 65min). Às diferentes amostras foram adicionadas diferentes percentagens de SDS. As amostras inseridas nos poços foram as seguintes: A - 2. 3μL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 4. 20μL IHMT *P3D7.20*, com adição de 0,1% SDS; 6. 20μL IHMT *P3D7.20*, com adição de 0,2% SDS; 8. 20μL IHMT *P3D7.20*, com adição de 0,5% SDS; 10. 20μL IHMT *P3D7.20*; B - 2. 3μL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 4. 20μL IHMT *P3D7.22*, com adição de 0,1% SDS; 6. 20μL IHMT *P3D7.22*, com adição de 0,2% SDS; 8. 20μL IHMT *P3D7.22*, com adição de 0,5% SDS; 10. 20μL IHMT *P3D7.22*; IHMT *P3D7.20* – Sobrenadante de cultura de eritrócitos Infetada por *P. falciparum*, da estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 20% (IHMT); IHMT *P3D7.22* – Sobrenadante de cultura de eritrócitos Infetada por *P. falciparum*, da estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 22% (IHMT);

Com a adição das diferentes percentagens de SDS às amostras de sobrenadantes de culturas de eritrócitos infetadas por *P. falciparum*, da estirpe 3D7, com níveis de parasitemia de 20% e 22%, foi obtida uma melhor separação das diferentes proteínas das amostras, tendo sido conseguida uma melhor desnaturação das mesmas. Apesar de o nível de desnaturação das diferentes proteínas das amostras ter sido claramente aumentado, não parecem existir diferenças entre os resultados obtidos com as diferentes percentagens de SDS adicionadas.

É também notório a mudança de posição da banda de maior intensidade, dos 75 kDa, para a região de cerca de 70 kDa, congruente com o peso molecular da albumina. Esta mudança ocorreu, provavelmente, devida ao aumento do grau de desnaturação desta proteína.

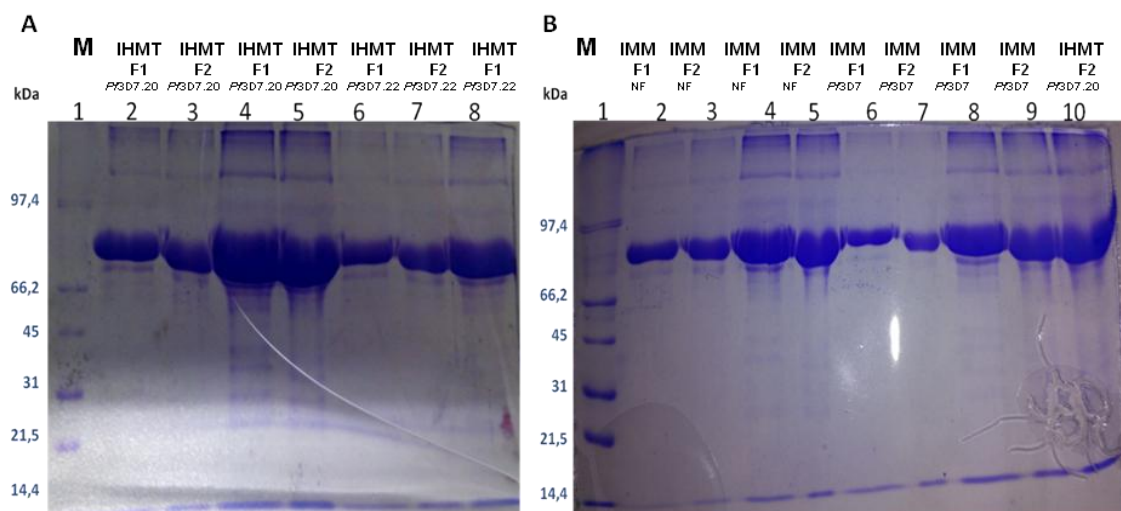
São também visíveis várias proteínas de menor peso molecular e abundância, sendo de registrar, o aumento da quantidade de proteína de cada amostra inseridas nos géis de poliacrilamida. Apesar desta variação, não foi possível retirar informação acerca das diferenças entre os diferentes perfis proteicos, nem a comparação dos resultados de ambos os géis, dado que não foi efetuada nenhuma etapa de quantificação de proteínas previamente à obtenção destes resultados.

### **3.1.1.2. Depleção das Proteínas de Maior Abundância e Peso Molecular, nomeadamente Albumina**

Os resultados obtidos por eletroforese SDS-PAGE, permitiram a conclusão de que as amostras apresentavam uma grande abundância de albumina, como seria espectável dado que esta é a proteína mais abundante na corrente sanguínea humana. Sendo que a abundância relativa desta proteína pode impossibilitar a visualização de outras proteínas de menor abundância e peso molecular, foi então otimizada a sua remoção das diferentes amostras.

Foi testada a utilização de Amicons Ultra-0.5, com colunas que apresentavam um limite de exclusão molecular de 50 kDa. Após a utilização deste sistema, de acordo com o procedimento descrito em 2.2.2.1, os resultados obtidos foram analisados através de eletroforese SDS-PAGE, com um gel de 10% de poliacrilamida, no qual foram inseridas as frações das amostras que passaram as colunas dos Amicons, ou seja, que contêm as proteínas de peso molecular inferior a 50 kDa. De cada amostra de sobrenadante de culturas de eritrócitos, cedidas pelo IMM e IHMT, à exceção da amostra de sobrenadantes de cultura não infetada, cedida pelo IHMT, dado que esta ainda não se encontrava disponível, foram adicionadas a primeira (F1), e segunda fração (F2), provenientes da utilização dos Amicons Ultra-0,5 com colunas com um limite de exclusão molecular de 50 kDa.

Os resultados obtidos foram visualizados através da técnica de eletroforese SDS-PAGE, tendo sido realizado um gel de 10% de poliacrilamida. Na figura 3.4 são apresentados os géis de poliacrilamida obtidos.



**Figura 3.4.** Géis SDS-PAGE (10% Poliacrilamida / 150V/ 62min). Foram adicionadas a primeira e segunda frações de amostra, que foram obtidas através da passagem das mesmas pelo sistema Amicon Ultra-0,5, com um limite de exclusão de peso molecular de 50 kDa. As amostras inseridas nos poços foram as seguintes: A - 1. 3 $\mu$ L Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 2. 17 $\mu$ L IMM NF (Filtrado 1); 3. 19 $\mu$ L IMM NF (Filtrado 1); 4. 17 $\mu$ L IMM NF (Filtrado 2); 5. 19 $\mu$ L IMM NF (Filtrado 2); 6. 17 $\mu$ L IMM *Pf3D7* (Filtrado 1); 7. 19 $\mu$ L IMM *Pf3D7* (Filtrado 1); 8. 17 $\mu$ L IMM *Pf3D7* (Filtrado 2); 9. 19 $\mu$ L IMM *Pf3D7* (Filtrado 2); 10. 19 $\mu$ L IHMT *Pf3D7.22* (Filtrado 2); B - 1.3 $\mu$ L Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 2. 17 $\mu$ L IHMT *Pf3D7.20* (Filtrado 1); 3. 19 $\mu$ L IHMT *Pf3D7.20* (Filtrado 1); 4. 17 $\mu$ L IHMT *Pf3D7.20* (Filtrado 2); 5. 19 $\mu$ L IHMT *Pf3D7.20* (Filtrado 2); 6. 17 $\mu$ L IHMT *Pf3D7.22* (Filtrado 1); 7. 19 $\mu$ L IHMT *Pf3D7.22* (Filtrado 1); 8. 17 $\mu$ L IHMT *Pf3D7.22*; IMM *Pf3D7* – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, da estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 10% (IMM); IHMT *Pf3D7.20* – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, da estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 20% (IHMT); IHMT *Pf3D7.22* – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, da estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 22% (IHMT).

Apesar de a remoção de albumina ser claramente visível, nos resultados apresentados na Figura 3.4, existe ainda uma grande quantidade desta proteína nas amostras, e ao contrário do que seria expectável, dado o limite de exclusão molecular de 50 kDa das colunas dos Amicons Ultra-0,5 utilizados, existem ainda bastantes proteínas de elevado peso molecular nas amostras, podendo esta ser devida à saturação da membrana utilizada.

Tendo em conta os resultados obtidos, as amostras, que tinham sido previamente passadas em Amicons Ultra-0,5, com um limite de exclusão de peso molecular de 50 kDa, foram utilizadas com o *kit AlbuminOut*, da G-Biosciences, para atingir um maior nível de remoção de albumina das amostras, em comparação com os resultados obtidos previamente. Os dois sistemas foram utilizados de forma sequencial, tendo sido invertida a ordem dos dois procedimentos, ou seja, as diferentes amostras de sobrenadantes de culturas foram passadas por Amicons Ultra-0,5, com *cut-off* de 50 kDa, e seguidamente pelo *kit AlbuminOut*, e vice-versa.

Após a utilização destes dois sistemas, de forma sequencial, de acordo com o procedimento descrito em 2.2.2.3 e 2.2.2.4, foi realizada, posteriormente, uma etapa de concentração das amostras utilizando o sistema Amicon Ultra-4, com um limite de exclusão de

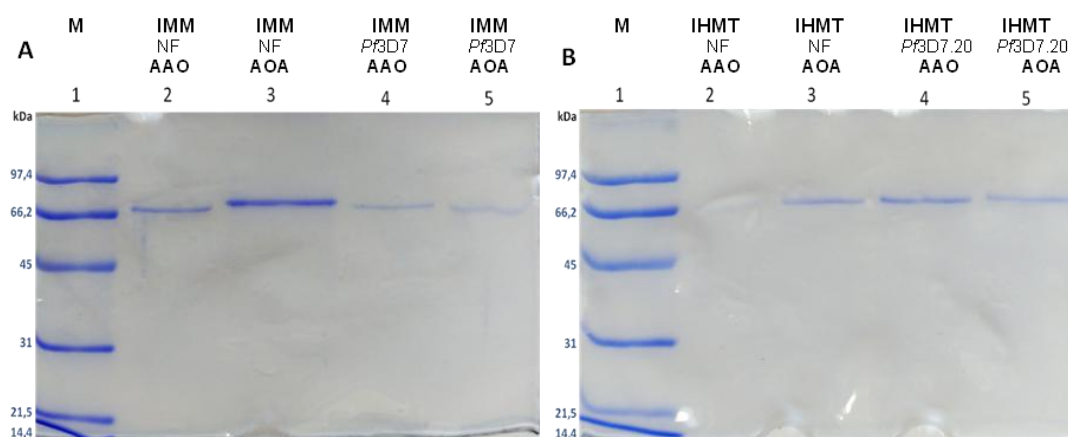
peso molecular de 3 kDa. Os resultados obtidos foram visualizados através de um gel de 10% de poliacrilamida, através da técnica de eletroforese SDS-PAGE.

Para a utilização da mesma quantidade de proteína em géis de poliacrilamida, para ser possível a comparação direta entre os diferentes perfis proteicos das amostras, assim como a sua abundância relativa, as amostras foram previamente quantificadas, a nível proteico, através do método *Pierce 660nm Protein Assay Kit*, conforme descrito em 2.7.3. Os resultados desta etapa de quantificação podem ser consultados na tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Valores de quantidade de proteína, apresentados em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , das amostras de sobrenadantes de culturas de eritrócitos, cedidas pelo IMM e IHMT, após a utilização de Amicons Ultra-0,5 50K e o *kit AlbuminOut*. As amostras foram posteriormente concentradas, com Amicons Ultra-0,4 3K, numa razão de cerca de 1:15.

Amostra de Sobrenadante de Culturas de Eritrócitos	Tratamento das Amostras	Quantidade de Proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Cultura Não Infetada (IMM)	Amicons Ultra-0,5 50K, seguido de <i>kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences	0,0293
	<i>Kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences, seguido de Amicons Ultra-0,5 50K	0,1827
Cultura Infetada por <i>P. falciparum</i> da estirpe 3D7 (10% Parasitemia) (IMM)	Amicons Ultra-0,5 50K, seguido de <i>kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences	0,0320
	<i>Kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences, seguido de Amicons Ultra-0,5 50K	0,0297
Cultura Não Infetada (IHMT)	Amicons Ultra-0,5 50K, seguido de <i>kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences	0,0690
	<i>Kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences, seguido de Amicons Ultra-0,5 50K	0,1057
Cultura Infetada por <i>P. falciparum</i> da estirpe 3D7 (20% Parasitemia) (IHMT)	Amicons Ultra-0,5 50K, seguido de <i>kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences	0,0763
	<i>Kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences, seguido de Amicons Ultra-0,5 50K	0,0893

Os resultados de quantificação de proteínas obtidos para as diferentes amostras de sobrenadantes de culturas de eritrócitos, cedidas pelo IMM e IHMT, são bastante reduzidos. Estes resultados foram avaliados através de géis de poliacrilamida, pela técnica de eletroforese SDS-PAGE, tendo sido inseridos nos géis  $1,5\mu\text{g}$  de proteína de cada amostra. O gel de poliacrilamida obtido pode ser visualizado na figura 3.5.

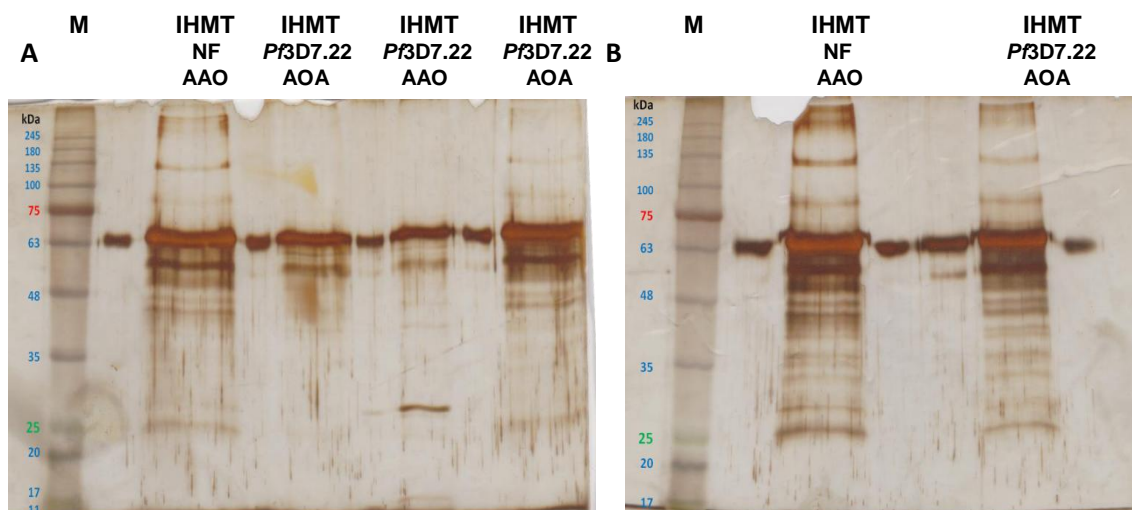


**Figura 3.5.** Géis SDS-PAGE (10% Poliacrilamida / 150V/ 62min). Foram adicionados 1,5µg de conteúdo proteico de cada amostra. As amostras referidas como AAO, foram passadas primeiramente em Amicons Ultra-0,5 com um limite de exclusão de peso molecular de 50 kDa, e seguidamente pelo *kit AlbuminOut*, da G-Biosciences. As amostras referidas como AOA foram tratadas pelo processo inverso. As amostras inseridas nos diferentes poços foram as seguintes: A - 1. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 2. IMM NF AAO; 3. IMM NF AOA; 4. IMM *P3D7* AAO; 5. IMM *P3D7* AOA; B - 1. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 2. IHMT NF AAO; 3. IHMT NF AOA; 4. IHMT *P3D7.20* AAO; 5. IHMT *P3D7.20* AOA; IMM NF – Sobrenadante de cultura de eritrócitos não infectados (IMM); IMM *P3D7* – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, da estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 10% (IMM); IHMT *P3D7.20* – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, da estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 20% (IHMT).

É evidente a baixa concentração proteica destas amostras de sobrenadantes de culturas de eritrócitos, não infectados e infectados com malária causada por *P. falciparum*, tendo os valores referentes à etapa de quantificação de proteínas realizada sido apresentados na Tabela 3.1.

Com o objetivo de confirmar a presença das diferentes proteínas das amostras, assim como visualizar os diferentes conjuntos de proteínas das amostras, foram realizados géis de poliacrilamida, e foram posteriormente utilizados para a técnica de eletroforese SDS-PAGE. No entanto, após a etapa de eletroforese, os géis foram corados com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), através do *kit PlusOne Silver Staining Kit*, da GE Healthcare, conforme descrito em 2.7.2. Para a utilização deste procedimento, foram utilizados 0,5µg e 1µg de amostras de sobrenadantes de culturas de eritrócitos, cedidas pelo IHMT, por estas apresentarem um maior nível de parasitemia que as cedidas pelo IMM.

Os resultados obtidos pela técnica de eletroforese SDS-PAGE, com coloração dos géis de poliacrilamida com nitrato de prata podem ser visualizados na figura 3.6.



**Figura 3.6.** Géis SDS-PAGE (10% Poliacrilamida / 150V/ 62min). Os géis foram corados com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ). Foram adicionados, no gel A, 0,5 $\mu\text{g}$  de quantidade de proteína de cada amostra, e 1 $\mu\text{g}$  no gel B. As amostras referidas como AAO, foram passadas primeiramente em Amicons Ultra-0,5 com um limite de exclusão de peso molecular de 50 kDa, e seguidamente pelo *kit AlbuminOut*, da G-Biosciences. As amostras referidas como AOA foram tratadas pelo processo inverso. As amostras inseridas nos diferentes poços foram as seguintes: A - 1. 3 $\mu\text{L}$  Marcador de pesos moleculares NZY Tech Protein Colour Marker II (11-245kDa); 3. IHMT NF AAO; 5. IHMT NF AOA; 7. IHMT *P3D7.22* AAO; 9. IHMT *P3D7.22* AOA; B - 2. 3 $\mu\text{L}$  Marcador de pesos moleculares NZY Tech Protein Colour Marker II (11-245kDa); 4. IHMT NF AA; 7. IHMT *P3D7.22* AOA; IHMT NF – Sobrenadante de cultura de eritrócitos não infectados (IHMT); IHMT *P3D7.22* – Sobrenadante de cultura de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, da estirpe 3D7, com um nível de parasitemia de 22% (IHMT);

Os resultados obtidos pela técnica de SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, demonstram que apesar da reduzida quantidade de proteína presente nas diversas amostras de sobrenadantes de culturas utilizados neste projeto, impossível de visualizar com a coloração com azul de Coomassie R-250, estas se encontram presentes nas amostras. As concentrações obtidas não são no entanto compatíveis com a realização da técnica de eletroforese bidimensional, para a qual foram necessários cerca de 100 $\mu\text{L}$ , com uma concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Apesar de uma boa eficiência na remoção de albumina das amostras, o conteúdo proteico destas amostras de sobrenadantes de culturas de eritrócitos, cedidas pelo IMM e IHMT, é bastante reduzido.

### **3.1.2. Soros Humanos, de Indivíduo Saudável, Saudável com Historial Clínico de Malária, e Infectado com malária de *P. falciparum*, cedidas pelo IHMT**

As amostras de soros humanos foram igualmente tratadas com o objetivo de remover as proteínas de maior abundância relativa e maior peso molecular das diferentes amostras. Foram do mesmo modo, testados os métodos descritos anteriormente para esta otimização, com a utilização de Amicons Ultra-0,5 50K e o *kit AlbuminOut*, da G-Biosciences.

#### **3.1.2.1. Depleção das Proteínas de Maior Abundância e Peso Molecular, nomeadamente Albumina**

Sendo que os métodos de remoção das proteínas mais abundantes e de maior peso molecular utilizados anteriormente, levavam à obtenção de amostras com um conteúdo proteico bastante reduzido, foi delineada uma nova estratégia para aumentar o conteúdo proteico final, e obter ainda assim uma eficiente remoção das proteínas de maior abundância e peso molecular, nomeadamente albumina. Esta estratégia compreende a utilização de Amicons Ultra-0,5, com membranas com um limite de exclusão de peso molecular de 50 kDa, seguida da sua lavagem com 2 volumes de 400µL de tampão fosfato sódio 5mM, com um pH de 7,2, conforme descrito em 2.2.2.5.

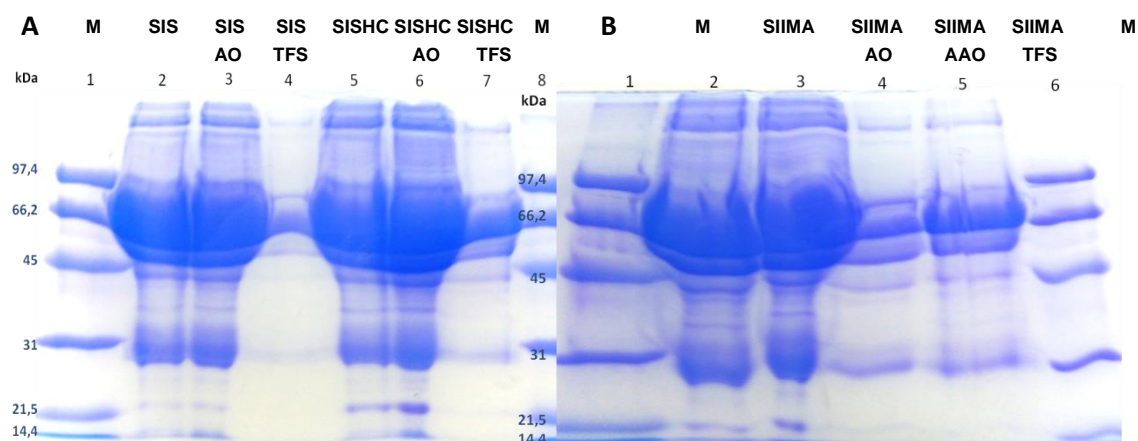
Foi realizada uma etapa de quantificação proteica das diferentes amostras de soro humano, gentilmente cedidas pelo IHMT, através do método *Pierce 660nm Protein Assay Kit*, conforme descrito em 2.7.3. Os resultados referentes a esta etapa de quantificação podem ser visualizados na tabela 3.2.

**Tabela 3.2.** Valores de quantidade de proteína, apresentados em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , das amostras de soro humanos, cedidas pelo IHMT, após a utilização de vários tratamentos para a otimização das quantidades relativas de proteínas das amostras.

Amostra de Soros Humanos (IHMT)	Tratamento das Amostras	Quantidade de Proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Soro de Indivíduo Saudável	-	62,4833
	<i>Kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences	24,0100
	Amicons Ultra-0,5 50K, seguido de <i>kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences	0,2537
	<i>Kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences, seguido de Amicons Ultra-0,5 50K	0,0307
	Amicons Ultra-0,5 50K, com lavagem com 2x 400 $\mu\text{L}$ tampão fostafo sódio 5mM pH 7,2	1,7400
Soro de Indivíduo Saudável, com Historial Clínico de Malária	-	58,5667
	<i>Kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences	18,7800
	Amicons Ultra-0,5 50K, seguido de <i>kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences	0,0310
	<i>Kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences, seguido de Amicons Ultra-0,5 50K	0,1013
	Amicons Ultra-0,5 50K, com lavagem com 2x 400 $\mu\text{L}$ tampão fostafo sódio 5mM pH 7,2	3,3767
Soro de Indivíduo Infetado com Malária Aguda, causada por <i>P. falciparum</i>	-	66,0333
	<i>Kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences	26,7100
	Amicons Ultra-0,5 50K, seguido de <i>kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences	0,5473
	<i>Kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences, seguido de Amicons Ultra-0,5 50K	0,0333
	Amicons Ultra-0,5 50K, com lavagem com 2x 400 $\mu\text{L}$ tampão fostafo sódio 5mM pH 7,2	4,6533

Os resultados obtidos permitem concluir que, com a utilização das amostras de soro humano, a quantidade de proteína de cada amostra, obtida após o tratamento das mesmas, é superior ao obtido com as amostras de sobrenadantes de culturas de eritrócitos. Após a realização da etapa de quantificação proteica das amostras, os resultados dos diferentes tratamentos das amostras realizados, foram avaliados com a técnica de eletroforese SDS-PAGE. Os géis de poliacrilamida obtidos podem ser consultados na figura 3.7.





**Figura 3.7.** Géis SDS-PAGE (10% Poliacrilamida / 150V/ 70min). Foram adicionados 1µg de conteúdo proteico de cada amostra. As amostras referidas como AO, foram tratados com o *kit* AlbuminOut. As amostras referidas como AAO, foram passadas primeiramente em Amicons Ultra-0,5 com um limite de exclusão de peso molecular de 50 kDa, e seguidamente pelo *kit* AlbuminOut, da G-Biosciences. As amostras referidas como TFS foram tratadas com Amicons Ultra-0,5 50K, e posterior lavagem das colunas com 2x 400µL de tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,2. As amostras inseridas nos diferentes poços foram as seguintes: A - 1. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 2. SIS; 3. SIS AO; 4. SIS TFS 5mM pH 7,2; 5. SISHC; 6. SISHC AO; 7. SISHC TFS 5mM pH 7,2; 8. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); B - 1. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); 2. SIIMA; 3. SIIMA AO; 4. SIIMA AAO; 5. SIIMA TFS 5mM pH 7,2; 6. 3µL Marcador de pesos moleculares Biorad Unstained Standard Low Range (14,4-97,4kDa); SIS – Soro de indivíduo saudável (IHMT); SISHC – Soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária (IHMT); SIIMA – Soro de indivíduo infetado com malária aguda de *P. falciparum* (IHMT).

Com base nos valores obtidos da quantificação de proteína das amostras, e pela observação dos resultados dos géis de poliacrilamida obtidos através da técnica de electroforese SDS-PAGE com as amostras de soros humanos, cedidas pelo IHMT foi possível concluir os seguintes aspetos quanto aos métodos de tratamento das amostras utilizados. No que diz respeito ao tratamento através do *kit* AlbuminOut, a quantidade de albumina presente nas amostras provoca a saturação a coluna do *kit*, pelo que este processo, embora permita a obtenção de amostras com valores de quantidade de proteína bastante elevados, é notório que grande parte desta proteína corresponde a albumina.

Quanto aos processos em que foram utilizados, de forma sequencial, Amicons Ultra 0,5, com um limite de exclusão molecular de 50 kDa, e o *kit* AlbuminOut, da G-Biosciences, foi possível concluir, que o processo realizado pela ordem acima descrita, ou seja Amicons Ultra-0,5 50K, e seguidamente o *kit* AlbuminOut, é o mais vantajoso destes dois processos, pois a passagem pelos Amicons permite a remoção de uma grande quantidade de albumina das amostras, aumentando assim a eficiência da passagem pelo *kit* AlbuminOut, dificultando a saturação do *kit* com albumina. Começando o processo com a passagem no *kit* AlbuminOut, a saturação do kit não permite uma remoção tão eficiente de albumina das amostras de soros.

A utilização do método de tratamento Amicons Ultra-0,5, seguido de lavagem das colunas com 2 volumes de 400µL de tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,2, permite não só a obtenção de uma elevada quantidade de proteína das diferentes amostras, mas também uma razoável eficiência na remoção das proteínas de maior abundância e peso molecular, nomeadamente, albumina. Este método foi definido como o mais vantajoso para a otimização em questão das amostras de soros humanos, tendo as amostras otimizadas por este método, sido selecionadas para a segunda etapa deste projeto, a realização da técnica de eletroforese bidimensional, para permitir a separação das proteínas das diferentes amostras pelo seu ponto isoelétrico, numa primeira dimensão, e pelo seu peso molecular, numa segunda dimensão.

É necessário ter em conta que estas amostras foram colhidas sem qualquer adição de inibidores de proteases, e foram armazenadas a uma temperatura de -20°C, não sendo assim possível garantir a integridade do conteúdo proteico destas amostras, tendo por isso qualquer resultado obtido através da análise destas amostras que ser confirmado através da utilização de amostras que tenham sido colhidas e armazenadas com o intuito de preservar, ao máximo, o seu conteúdo proteico, através da adição de inibidores de proteases, assim como o seu armazenamento a uma temperatura de -80°C.

### **3.2. Electroforese Bidimensional**

As amostras de soros humanos, otimizadas através do sistema Amicons Ultra-0,5 50K, seguidos de lavagem das colunas com 2x 400µL de tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,2, foram então utilizadas para a realização da técnica de eletroforese bidimensional, realizada de acordo com o procedimento descrito em 2.2. Foram também utilizadas as amostras de soro de indivíduo saudável e de indivíduo infetado com malária aguda causada por *P. falciparum*, que foram tratadas pelo método Amicons Ultra-0,5 50K, seguido do *kit AlbuminOut*.

Para realizar a eliminação dos contaminantes, através da precipitação das proteínas, foi utilizado o *kit 2D Clean Up Kit*, GE Healthcare. A utilização deste método permite também concentrar as amostras. Após a realização desta etapa, o conteúdo proteico das diferentes amostras foi quantificado, através do método descrito em 2.7.3, e os resultados obtidos podem ser visualizados na tabela 3.3.

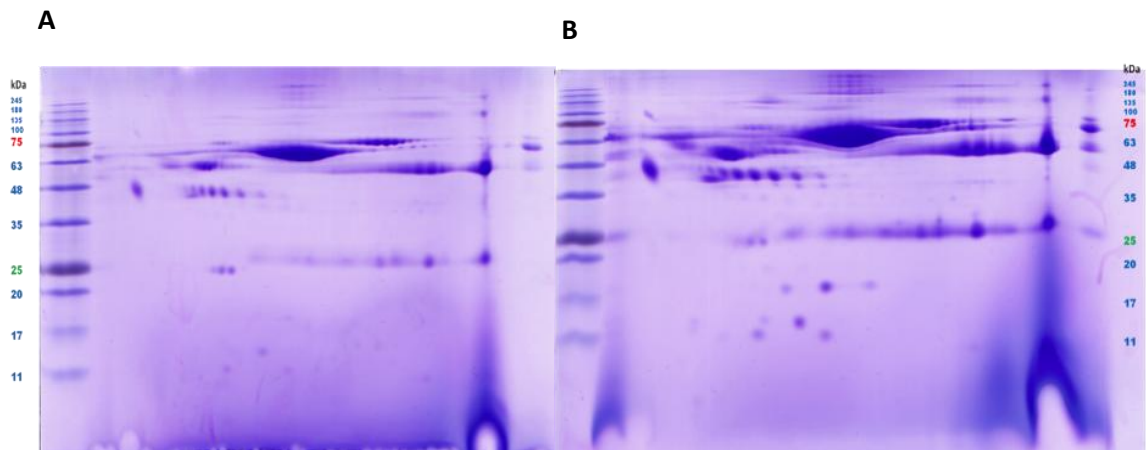
**Tabela 3.3.** Valores de quantidade de proteína, apresentados em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , das amostras de soro humanos, cedidas pelo IHMT, selecionadas para a etapa de eletroforese bidimensional. Os valores iniciais e finais de quantidade de proteína são referentes ao conteúdo proteico das amostras, antes e depois da realização do *2D Clean Up Kit*, da GE Healthcare.

Amostra de Soro Humano (IHMT)	Tratamento da Amostra	Quantidade de Proteína inicial ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Quantidade de Proteína final ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Soro de Indivíduo Saudável		1,7400	1,6806
Soro de Indivíduo Saudável, com historial clínico de malária	Amicons Ultra-0,5 50K, com lavagem com 2x 400 $\mu\text{L}$ tampão fosfato sódio 5mM pH 7,2	3,3767	3,1250
Soro de indivíduo infetado com malária aguda, causada por <i>P. falciparum</i>		4,6533	4,4444
Soro de Indivíduo Saudável		0,2537	0,6779
Soro de indivíduo infetado com malária aguda, causada por <i>P. falciparum</i>	Amicons Ultra-0,5 50K, seguido de <i>kit AlbuminOut</i> , G-Biosciences	0,5473	2,000

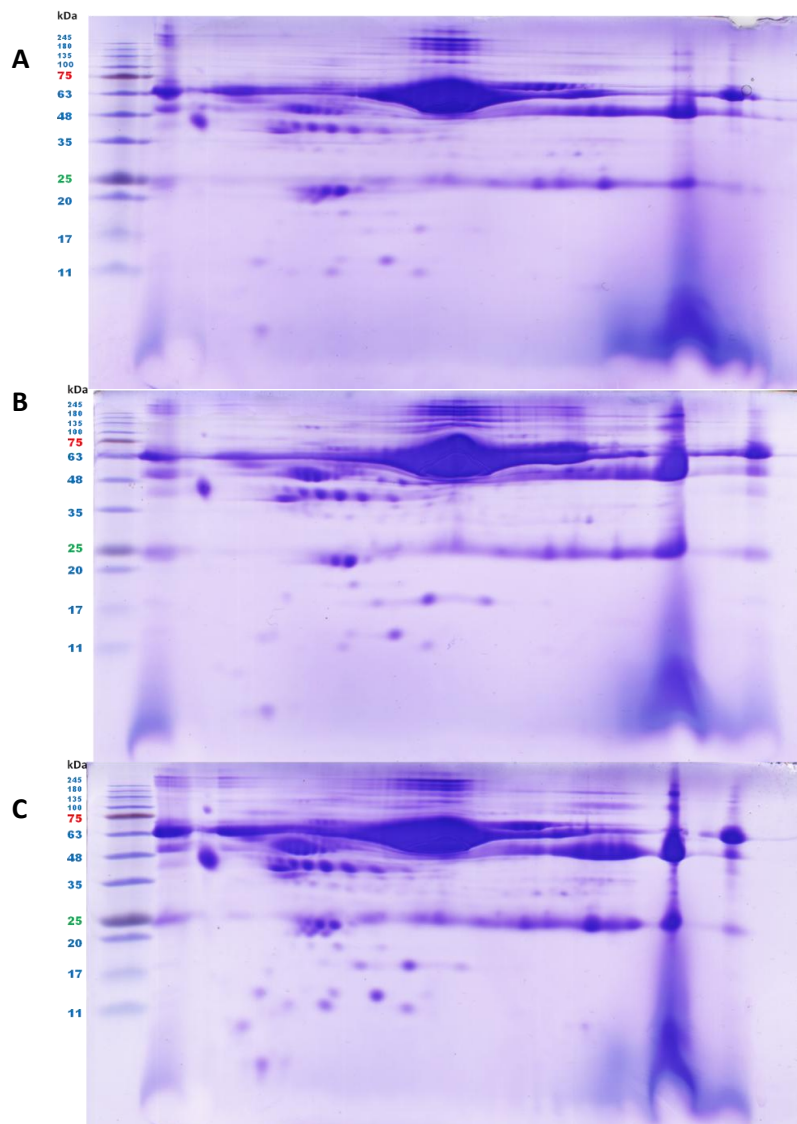
Foram então realizados, através da técnica de eletroforese bidimensional (2DE), géis de poliacrilamida para cada uma das amostras acima referidas, com o objetivo de obter uma separação das diferentes proteínas das amostras de acordo com o seu ponto isoelétrico, numa primeira etapa, e pelo seu peso molecular, posteriormente, de acordo com o procedimento descrito e apresentado em 2.2.

Foram inseridos, para as amostras que foram tratadas com Amicons Ultra-0,5 50K, seguido do *kit AlbuminOut*, G-Biosciences, 80 $\mu\text{g}$  de quantidade total de proteína. Para as amostras que foram tratadas através de Amicons Ultra-0,5 50K, com lavagem com 2x 400 $\mu\text{L}$  tampão fosfato sódio 5mM pH 7,2, foram utilizados 200 $\mu\text{g}$  de quantidade de proteína de cada amostra.

Os resultados obtidos, através da técnica de eletroforese bidimensional, para as diferentes amostras, podem ser visualizados nas figuras 3.8, para as amostras que foram tratadas através de Amicons Ultra-0,5 50K, seguido do *kit AlbuminOut*, G-Biosciences, e na figura 3.9., para as amostras tratadas através de Amicons Ultra-0,5 50K, com lavagem com 2x 400 $\mu\text{L}$  tampão fosfato sódio 5mM pH 7,2.



**Figura 3.8.** Géis de poliacrilamida (10% Poliacrilamida / 30V (60min) / 100V (60min). Foram adicionados 80µg de conteúdo proteico de cada amostra. A figura A é referente à amostra de soro humano de um indivíduo saudável, e a figura B é referente à amostra de soro de um indivíduo infectado com malária aguda, causada por *P. falciparum*. Ambas as amostras foram tratadas através de Amicons Ultra-0,5 50K, seguido do kit AlbuminOut.



**Figura 3.9.** Géis de poliacrilamida (10% Poliacrilamida / 30V (60min) / 100V (60min). Foram adicionados 200µg de conteúdo proteico de cada amostra. A figura A é referente à amostra de soro humano de um indivíduo saudável, a figura B é referente à amostra de soro humano de um indivíduo saudável, com historial clínico de malária e a figura C é referente à amostra de soro de um indivíduo infectado com malária aguda, causada por *P. falciparum*. As amostras foram tratadas através de Amicons Ultra-0,5 50K, com lavagem com 2x 400µL tampão fosfato sódio 5mM pH 7,2.

As imagens dos géis obtidos por eletroforese bidimensional foram adquiridas com recurso a um scanner *ImageScanner II*, da GE Healthcare, tendo estas sido obtidas com uma resolução de 300dpi.

### **3.3. Análise Dos Padrões De Spots De Proteínas, obtidos pela técnica de Eletroforese Bidimensional, através do Software *Melanie 7.0*, GeneBio**

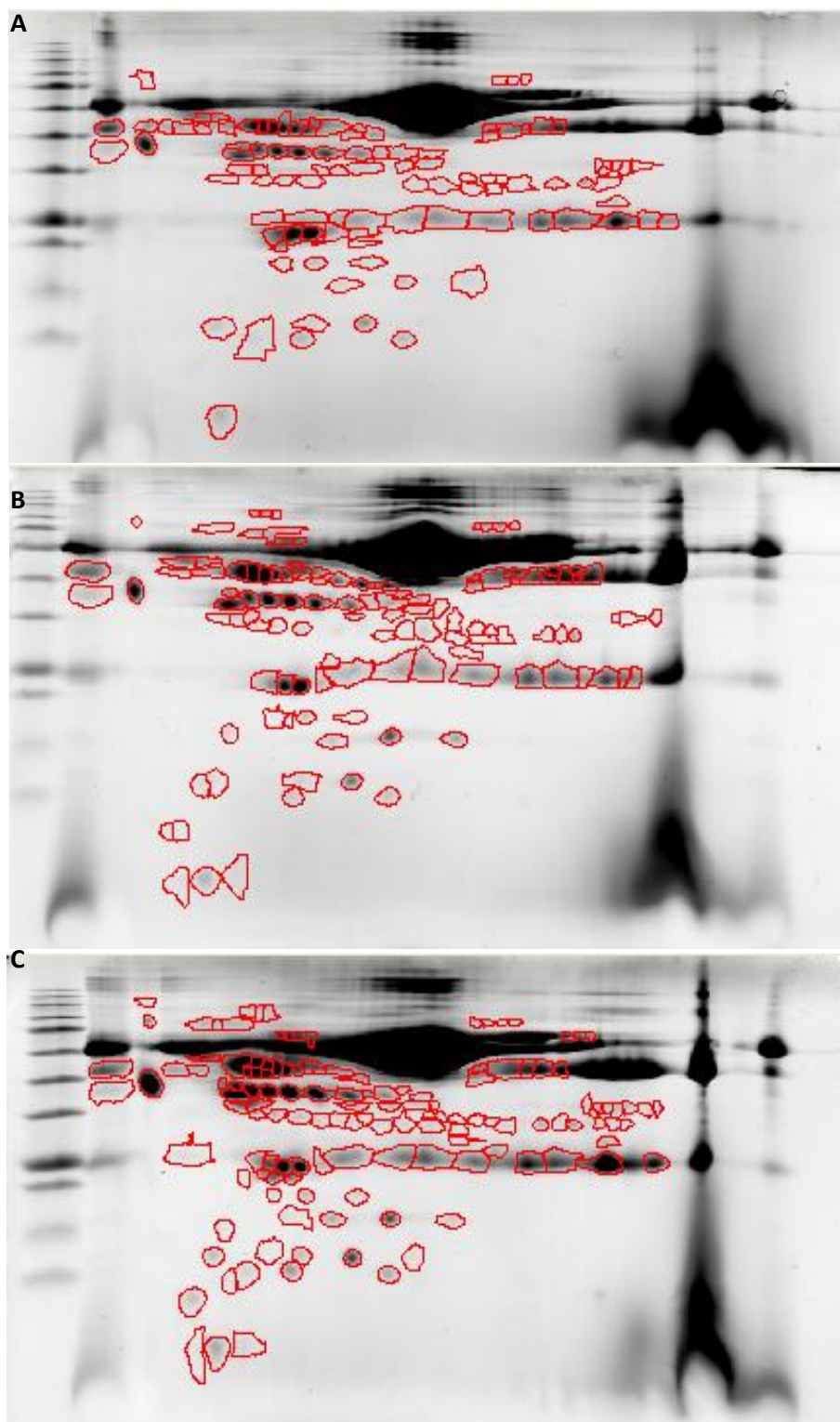
A análise dos padrões de *spots*, em que cada *spot* corresponde a uma proteína, das diferentes amostras foi realizada com o software *Melanie 7.0*, GeneBio. Os *spots* proteicos de cada imagem foram detetados e analisados conforme o procedimento descrito em 2.4.

Dado que a quantidade de proteína que foi inserida das amostras tratadas por Amicons Ultra-0,5 50K, seguido de lavagem com 2x 400µL de tampão fosfato sódio 5mM pH 7,2 (200µg), foi bastante superior à quantidade de proteína inserida de cada amostra tratada por Amicons Ultra-0.5 50K, seguido do *kit AlbuminOut* (80µg), estas foram selecionadas para análise dos padrões de *spots* proteicos obtidos, através do software *Melanie 7.0*, da GeneBio.

Foram considerados, para a análise, um conjunto inicial de 358 *spots* contidos nas diferentes amostras, de soro de um indivíduo saudável, de soro de um indivíduo saudável, com historial clínico de malária, e de soro de um indivíduo infectado com malária aguda, causado por *P. falciparum*. Apesar deste conjunto inicial de *spots*, apenas foram utilizados, para análise final, os *spots* de proteínas cujo peso molecular é inferior a 50kDa, devido à impossibilidade de análise dos *spots* correspondentes a proteínas de maior peso molecular.

Deste conjunto de *spots*, 95 foram identificados em mais do que uma das amostras em estudo. Através do cálculo dos rácios entre os volumes destes *spots*, e os volumes do mesmo *spots* na amostra controlo, de um indivíduo saudável, foram considerados 51 *spots* como sendo de elevado interesse, dado que estes rácios calculados apresentavam valores inferiores a 0,7, ou superiores a 1,5, sendo estes indicativos de variações significativas nos níveis de expressão destas mesmas proteínas.

As imagens finais obtidas, após a análise dos diferentes padrões de *spots* proteicos com o software *Melanie 7.0*, são apresentadas na figura 3.10



**Figura 3.10.** Imagens dos diferentes padrões de *spots* proteicos, obtidos por eletroforese bidimensional, após a análise feita através do *software* Melanie 7.0, GeneBio. A vermelho estão marcados os *spots* que foram tomados em conta para a análise dos perfis proteicos das diferentes amostras de soros humanos, cedidas pelo IHMT. A figura A é referente à amostra de soro humano de um indivíduo saudável, A figura B é referente à amostra de soro humano de um indivíduo saudável, com historial clínico de malária. A figura C é referente à amostra de soro de um indivíduo infetado com malária aguda, causada por *P. falciparum*. Todas as amostras foram tratadas através de Amicons Ultra-0,5 50K, com lavagem com 2x 400µL tampão fosfato sódio 5mM pH 7,2.

### **3.4. Análise Dos *Spots* de Interesse – Análise Por Espectrometria De Massa (MALDI-TOF/TOF MS/MS)**

Inicialmente, foram excisados 43 *spots* proteicos considerados de grande interesse, ou seja, que aparentavam apresentar variações na sua abundância entre a amostra de soro de um indivíduo saudável, e as restantes, através da comparação visual entre os diferentes géis obtidos por eletroforese bidimensional e da análise de padrões de *spots* de proteínas, com o recurso ao software *Melanie 7.0*, GeneBio. Os *spots* de interesse foram excisados, e posteriormente enviados para análise por espectrometria de massa.

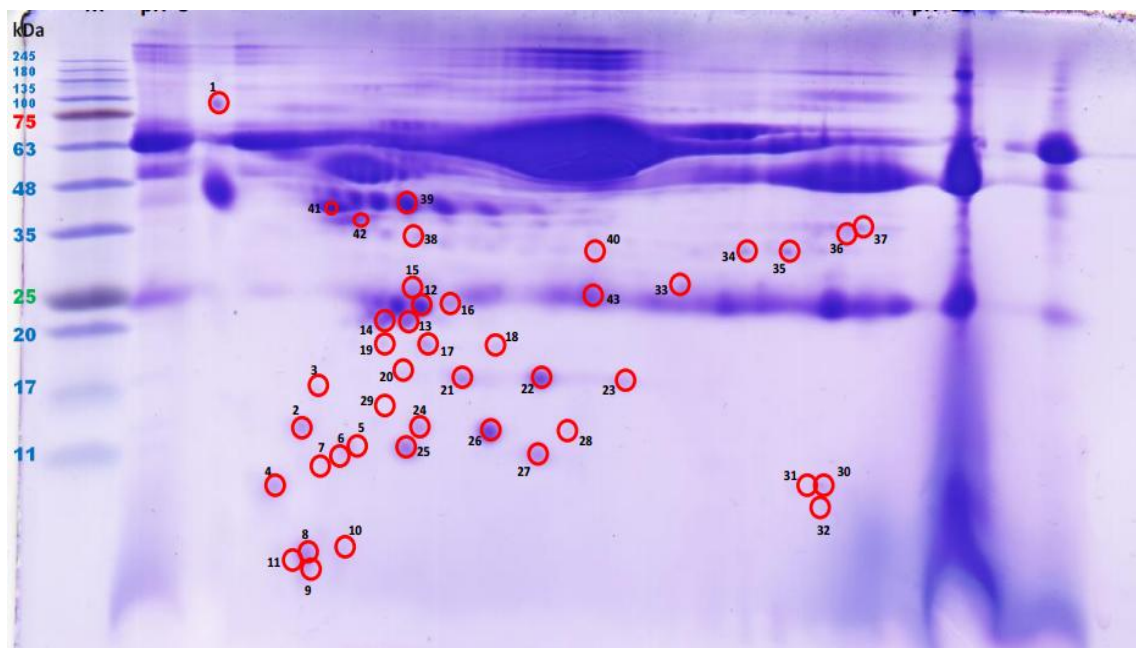
Estes *spots* proteicos foram analisados pelo Dr. Hugo Osório, no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), de acordo com o procedimento apresentado e descrito em 2.5.

### **3.5. Identificação Das Proteínas Analisadas Por Espectrometria De Massa (MALDI-TOF/TOF MS/MS) – Peptide Mass Fingerprint**

A identificação das proteínas analisadas por espectrometria de massa foi igualmente realizada pelo Dr. Hugo Osório, no IPATIMUP. Esta identificação foi realizada através do método de *Peptide Mass Fingerprint*, por comparação entre os resultados obtidos por MS com a base de dados de sequências da UniProt, tendo os resultados sido comparados com as bases de dados de *Homo sapiens* e de *Plasmodium falciparum*.

A totalidade das 43 amostras excisadas, e analisadas por MS, foi posteriormente identificada por *Peptide Mass Fingerprint*, sendo que todas as amostras identificadas correspondem a proteínas humanas. As amostras que foram excisadas, para posterior identificação, podem ser consultadas na figura 3.11. As proteínas identificadas, assim como o *spot* proteico correspondente no gel de eletroforese bidimensional realizado com amostra de soro de um indivíduo infetado com malária aguda, e apresentado na figura 3.11, podem ser visualizados na tabela 3.4.





**Figura 3.11.** Representação dos 43 *spots* proteicos, do padrão de *spots* obtido pela técnica de eletroforese bidimensional, da amostra de soro de um indivíduo infectado com malária aguda, causado por *P. falciparum*, que foram excisados, e enviados para análise por espectrometria de massa e posterior identificação por *Peptide Mass Fingerprint*.

**Tabela 3.4.** Proteínas identificadas, correspondentes a *spots* proteicos nos géis obtidos através de eletroforese bidimensional, com identificação do organismo, da massa molecular (MM) e variação da quantidade de volume de cada spot, relativamente à amostra controle. Valores inferiores a 0,7 foram considerados sub-expressão e valores superiores a 1,5 referem-se a sobre-expressão.

Spot	Identificação da proteína (em inglês)	MM (Da)	Organismo	Variação da quantidade de volume do spot
1	<i>Alpha-1-acid glycoprotein (ORM1)</i>	23725	<i>Homo sapiens</i>	1,754
2	<i>Apolipoprotein A-1 (APOA1)</i>	30759	<i>Homo sapiens</i>	0,646
3	<i>Proline-rich protein 4 (PRR4)</i>	15088	<i>Homo sapiens</i>	* -
4	<i>Apolipoprotein A-1 (APOA1)</i>	30759	<i>Homo sapiens</i>	* -
5	<i>Haptoglobin (HP)</i>	45861	<i>Homo sapiens</i>	* -
6	<i>Haptoglobin (HP)</i>	45861	<i>Homo sapiens</i>	0,431



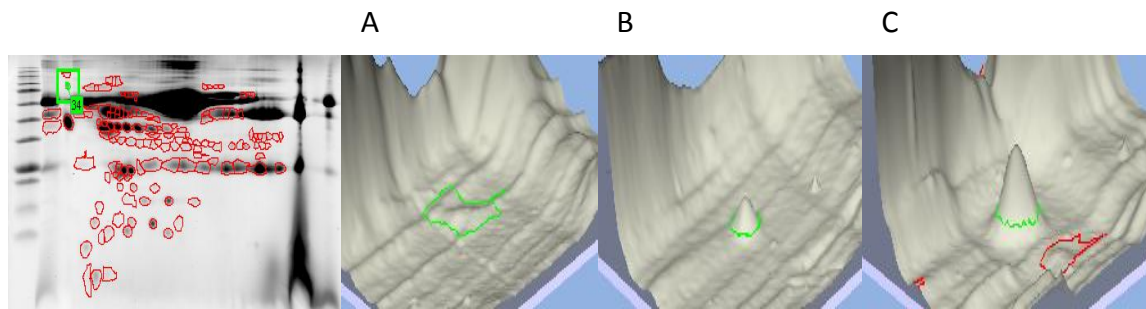
9	<i>Keratin, type I cytoskeletal 9 (KRT9)</i>	62255	<i>Homo sapiens</i>	- <sup>*</sup>
11	<i>Keratin 1 (KRT1)</i>	66101	<i>Homo sapiens</i>	- <sup>*</sup>
12	<i>Apolipoprotein A-1 (APOA1)</i>	30759	<i>Homo sapiens</i>	0,349
13	<i>Apolipoprotein A-1 (APOA1)</i>	30759	<i>Homo sapiens</i>	- <sup>*</sup>
14	<i>Apolipoprotein A-1 (APOA1)</i>	30759	<i>Homo sapiens</i>	1,242
15	<i>Ig kappa chain C region (IGKC)</i>	13160	<i>Homo sapiens</i>	- <sup>*</sup>
16	<i>Ig kappa chain C region (IGKC)</i>	13160	<i>Homo sapiens</i>	0,367
17	<i>Retinol-binding protein 4 (RBP4)</i>	23195	<i>Homo sapiens</i>	0,704
18	<i>Retinol-binding protein 4 (RBP4)</i>	23195	<i>Homo sapiens</i>	0,788
19	<i>Retinol-binding protein 4 (RBP4)</i>	23195	<i>Homo sapiens</i>	0,544
20	<i>Haptoglobin (HP)</i>	45861	<i>Homo sapiens</i>	- <sup>*</sup>
21	<i>Haptoglobin (HP)</i>	45861	<i>Homo sapiens</i>	2,197
22	<i>Haptoglobin (HP)</i>	45861	<i>Homo sapiens</i>	2,624
23	<i>Haptoglobin (HP)</i>	45861	<i>Homo sapiens</i>	0,693
24	<i>Transthyretin (TTR)</i>	15991	<i>Homo sapiens</i>	1,003
25	<i>Haptoglobin (HP)</i>	45861	<i>Homo sapiens</i>	1,118
26	<i>Transthyretin (TTR)</i>	15991	<i>Homo sapiens</i>	1,192
27	<i>Haptoglobin (HP)</i>	45861	<i>Homo sapiens</i>	1,011

28	<i>Transthyretin</i> (TTR)	15991	<i>Homo sapiens</i>	- <sup>*</sup>
29	<i>Transthyretin</i> (TTR)	15991	<i>Homo sapiens</i>	- <sup>*</sup>
30	<i>Hemoglobin subunit beta</i> (HBB)	16102	<i>Homo sapiens</i>	- <sup>*</sup>
31	<i>Hemoglobin subunit beta</i> (HBB)	16102	<i>Homo sapiens</i>	- <sup>*</sup>
32	<i>Hemoglobin subunit beta</i> (HBB)	16102	<i>Homo sapiens</i>	- <sup>*</sup>
33	<i>Ig kappa chain C region</i> (IGKC)	13160	<i>Homo sapiens</i>	- <sup>*</sup>
34	<i>Complement C4-A</i> (C4A)	194261	<i>Homo sapiens</i>	0,905
35	<i>Complement C4-A</i> (C4A)	194261	<i>Homo sapiens</i>	0,718
36	<i>Complement C4-A</i> (C4A)	194261	<i>Homo sapiens</i>	1,261
37	<i>IGH@ protein</i> (IGH@)		<i>Homo sapiens</i>	1,195
38	<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4</i> (ITIH4)	103521	<i>Homo sapiens</i>	1,268
39	<i>Haptoglobin</i> (HP)	45861	<i>Homo sapiens</i>	- <sup>*</sup>
40	<i>Albumin (Fragment)</i> (ALB)	68484	<i>Homo sapiens</i>	0,564
41	<i>Complement C3</i> (C3)	188569	<i>Homo sapiens</i>	0,784
42	<i>Complement C3</i> (C3)	188569	<i>Homo sapiens</i>	1,142
43	<i>Ig kappa chain C region</i> (IGKC)	13160	<i>Homo sapiens</i>	0.934

\* as amostras não apresentaram variações na quantidade de volume do spot, entre os a amostra de soro de um indivíduo saudável e de um indivíduo infetado com malária aguda, dado que estes spots proteicos não se encontravam presentes na amostra controlo.



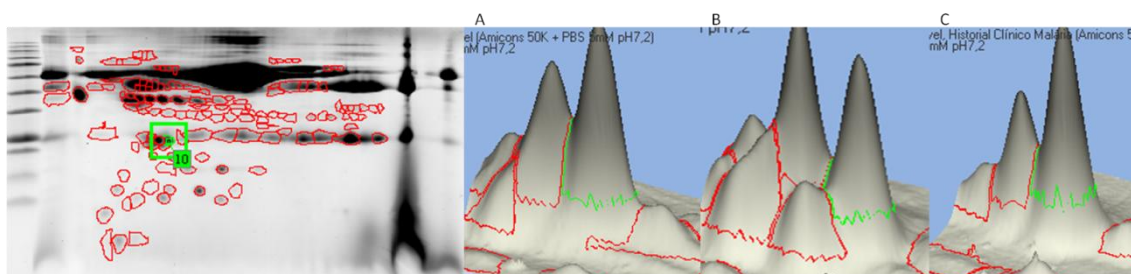
IL-6 e citocinas relacionadas com IL-6 (Baumann *et al*, 1990; Zhumin *et al*, 2015). Dado que a ORM1 é uma proteína positiva de fase aguda, segregada no plasma em casos de infeção, entre outros, é natural a variação da quantidade desta proteína identificada na amostra de soro de um indivíduo infetado com malária aguda de *P. falciparum*, sendo que esta variação foi considerada como sendo indicativa de sobre expressão desta proteína. Os *spots* proteicos referentes a esta proteína, nas amostras estudadas neste projeto, podem ser visualizados na figura 3.13.



**Figura 3.13.** Representação de imagens tridimensionais referentes ao *spot* proteico identificado como ORM1, nos géis obtidos por eletroforese bidimensional para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade de ORM1, correspondente a um *fold* de 1,754, indicativo de sobre expressão desta proteína.

A *apolipoprotein A-I* (APOA1), é uma das maiores proteínas constituintes de lipoproteínas de elevada densidade (HDL, do inglês *High Density Lipoprotein*), no plasma, ligando-se a lípidos para a formação de lipoproteínas (Orimadegun *et al*, 2014). A sua principal função é o transporte de lípidos, mas desempenha também um importante papel no reconhecimento de recetores de lipoproteínas, assim como na regulação de algumas enzimas participantes no metabolismo lipoprotéico (Rifai, 2000). Vários estudos reportaram níveis reduzidos de lípidos em pacientes infetados com malária (Djoumessi, 1989; Mfonkeu *et al*, 2010), apesar do número de estudos acerca da interconectividade entre a APOA1 e a infeção por *Plasmodium* ser bastante reduzido. Ainda assim, alguns estudos mostraram que o perfil lipídico de pacientes com malária sofre alterações consideráveis, sendo que estas alterações podem ser atribuídas à parasitemia de *Plasmodium* (Chagnon *et al*, 1985; Faucher *et al*, 2002). Uma possível explicação para esta redução dos níveis de lípidos em pacientes infetados com malária é o consumo excessivo destes por parte dos parasitas (Mamoun *et al*, 2010), dado que a síntese de lípidos ocorre no fígado, pelo qual os parasitas passam, sob a forma de esporozoítos para se desenvolverem e, posteriormente, entrarem na corrente sanguínea. Um dos *spots* proteicos

referentes a esta proteína, nas amostras estudadas neste projeto, podem ser visualizados na figura 3.14.

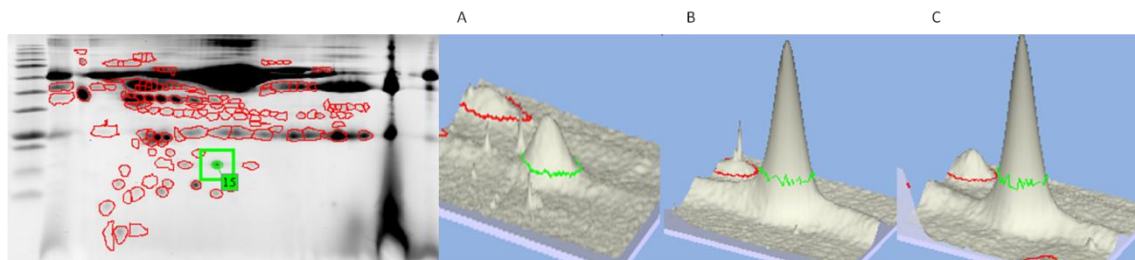


**Figura 3.14.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados como APOA1, nos géis obtidos por eletroforese bidimensional para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade de APOA1, correspondente a um *fold* de 0,349, indicativo de sub expressão desta proteína.

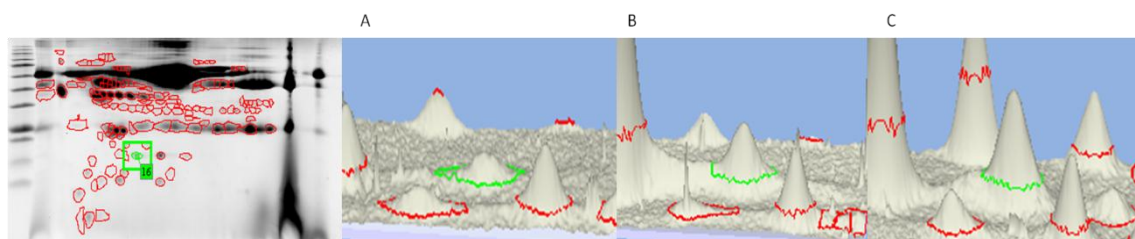
A *proline-rich protein 4* (PRR4), pertence ao grupo das PRPs básicas, que constituem cerca de 30% do conteúdo total das proteínas segregadas pelas glândulas parótidas, em humanos (Bennick, 1982; Messana *et al*, 2008). Em seres humanos, as proteínas ricas em prolina (PRP, do inglês *Proline-Rich Protein*), participam numa grande variedade de processos biológicos, como processamento e splicing de RNA (Komuro *et al*, 1999), modulação de vias de sinalização (Huang *et al*, 2005), ligação a proteínas com erros de *folding* (enrolamento) (Banerji *et al*, 1990) e organização de fibras de colagénio e desenvolvimento de condrócitos (Arndt *et al*, 2006), entre outros. Apesar do papel desempenhado nestes processos, a principal função destas proteínas aparenta estar relacionada com a ligação a outras proteínas, aumentando a interação de ligação entre estas devido à diminuição da perda de entropia aquando da sua ligação a péptidos rígidos, que é consequência das várias restrições conformacionais impostas pela presença de prolinas (Williamson, 1994).

Ao longo do tempo, o ser humano hospedeiro de *Plasmodium sp.*, desenvolveu mecanismos de proteção contra os efeitos nocivos (p.e. promoção de mecanismos pró-inflamatórios) da presença de grupos hemo livres em circulação (Mendonça *et al*, 2015). A haptoglobina (HP) é uma proteína de fase aguda, que se encontra presente na maioria dos fluidos corporais de seres humanos e de outros mamíferos. Esta liga-se a hemoglobina em livre circulação no plasma (Dobrysycka, 2009), facilitando a sua degradação por hemólise intravascular (Rogerson, 2006). Estudos anteriores demonstraram que o processo de hemólise,

durante a infecção de *Plasmodium sp.*, processo este induzido pelo parasita, leva ao subsequente aumento dos níveis de HP mas, à medida que se dá a formação do complexo HP-hemoglobina, os seus níveis em livre circulação são reduzidos, levando a hipo ou aptoglobulinemia, associadas à infecção de malária (Rougemont *et al*, 1998), que podem levar a uma redução dos sintomas da infecção, devido à sua toxicidade para parasitas do género *Plasmodium* (Imrie *et al*, 2006), durante a resposta de fase aguda (Imrie *et al*, 2004). Outros estudos reportaram, contrariamente, uma diminuição dos níveis de HP em pacientes infetados com malária e, embora estes resultados se apresentem como contraditórios com o papel da HP como uma proteína positiva de fase aguda, baixos níveis de expressão de HP podem resultar num aumento do nível da parasitemia de *Plasmodium* (Hurt *et al*, 1994; Kang *et al*, 2014). Alguns *spots* proteicos referentes a esta proteína, nas amostras estudadas neste projeto, podem ser visualizados nas figuras 3.15-3-17.

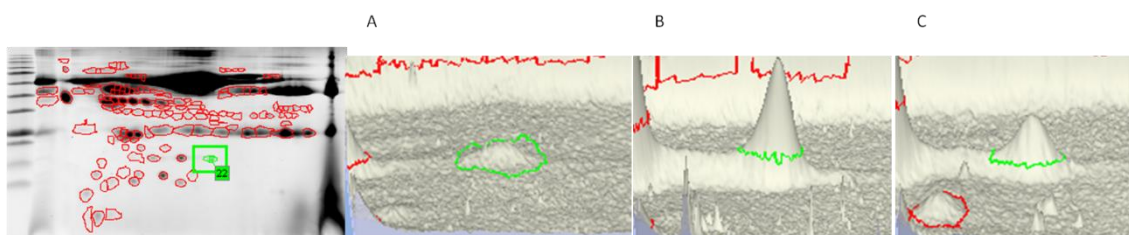


**Figura 3.15.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados como HP, nos géis obtidos por eletroforese bidimensional para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade de HP, correspondente a um *fold* de 2,624, indicativo de sobre expressão desta proteína.



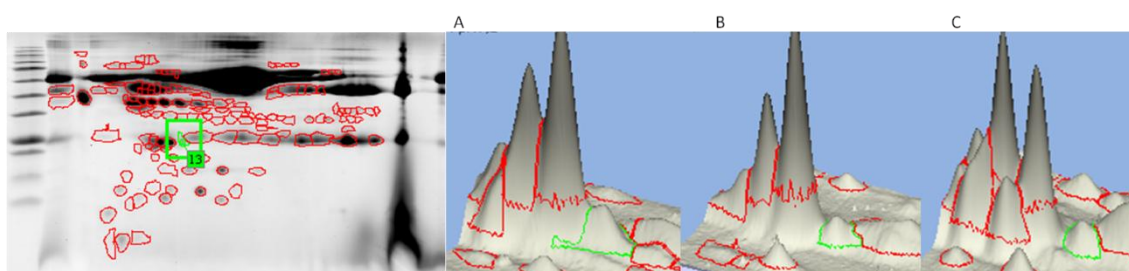
**Figura 3.16.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados como HP, nos géis obtidos por eletroforese bidimensional para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade de HP, correspondente a um *fold* de 2,197, indicativo de sobre expressão desta proteína.





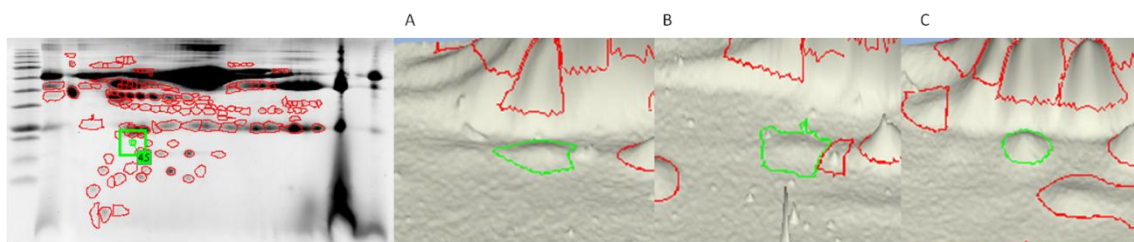
**Figura 3.17.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados como HP, nos géis obtidos por eletroforese bidimensional para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade de HP, correspondente a um *fold* de 0,693, indicativo de sub expressão desta proteína.

A *Ig Kappa Chain C region* (IGKC) pertence à família das imunoglobulinas, e é um dos tipos de cadeias leves que constituem as imunoglobulinas, sendo que estas apresentam duas cadeias pesadas, e das cadeias leves (kappa ou lambda). Estas cadeias leves têm uma grande importância, dado que é através da sua expressão que os diferentes anticorpos são produzidos pelos linfócitos B. Alguns estudos demonstraram a capacidade das cadeias leves das imunoglobulinas se ligarem a antígenos, facilitando a ativação de mastócitos (Redegeld, 2000), que desempenham um importante na proteção do sistema, estando envolvidos em processos como o tratamento de feridas, processos de angiogénese, tolerância imunológica e defesa contra agentes patogénicos (Polyzoidis *et al*, 2015; Silva *et al*, 2014). Estes estudos, assim como outros que demonstraram a capacidade de ativação, por parte de IGKC, da gânglia dorsal (Rijnierse, 2009), e de neutrófilos (Braber *et al*, 2012), confirmam o potencial papel da IGKC como mediador em doenças inflamatórias. Um dos *spots* proteicos referentes a esta proteína, nas amostras estudadas neste projeto, podem ser visualizados na figura 3.18.



**Figura 3.18.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados como IGKC, nos géis obtidos por eletroforese bidimensional para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade de IGKC, correspondente a um *fold* de 0,367, indicativo de sub expressão desta proteína.

A infecção de malária é acompanhada por um decréscimo dos níveis de vitamina A. O parasita *P. falciparum* absorve seletivamente vitamina A do seu hospedeiro, como demonstrado em estudos anteriores (Mizuno *et al*, 2003), e este facto aparenta estar relacionado com o seu metabolismo (Gouado *et al*, 2007). Apesar de a vitamina A ser essencial, em baixas concentrações, para diversos processos biológicos, elevadas concentrações desta vitamina têm um grande potencial citotóxico e oxidativo, sendo que elevadas quantidades são armazenadas no fígado, onde os parasitas de *Plasmodium* permanecem vários dias, antes da invasão dos eritrócitos. Foi proposto em estudos anteriores que o parasita emerge do fígado do hospedeiro coberto com vitamina A, e utiliza o ácido retinóico, o principal metabolito biologicamente ativo desta vitamina, como desestabilizador da membrana celular dos eritrócitos, durante a sua invasão. A hemólise e anemia característica da infecção de malária podem assim ser uma consequência da toxicidade de uma forma endógena de vitamina A, que apresenta elevados níveis de ácido retinóico, mas baixos níveis de retinol. O ácido retinóico é sintetizado através de retinol, e o retinol é transportado para os tecidos alvo, através da proteína RBP (do inglês *Retinol-binding Protein*). Estudos anteriores demonstraram que o retinol é um antagonista de fármacos anti maláricos, contribuindo para o crescimento do parasita. (Hamzah *et al*, 2003; Skinner-Adams *et al*, 1999), sugerindo que em infeções de malária os níveis de retinol são reduzidos, em parte devido à absorção seletiva de vitamina A, pelo parasita *Plasmodium*, e em parte pelas alterações na função hepática, provocados pela infecção de malária (Bhalla *et al*, 2006; Grobusch *et al*, 2005). Dado que os níveis de retinol foram descritos como sendo reduzidos em infeções de malária, esta redução pode explicar as variações na quantidade de RBP4 (do inglês *Retinol-binding Protein 4*), identificadas neste projeto, variações estas que foram consideradas com indicativas de sub expressão desta proteína na amostra de soro de um indivíduo infetado com malária aguda de *P. falciparum*. Um dos *spots* proteicos referentes a esta proteína, nas amostras estudadas neste projeto, podem ser visualizados na figura 3.19.



**Figura 3.19.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados como RBP4, nos géis obtidos por eletroforese bidimensional para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade de RBP4, correspondente a um *fold* de 0,544, indicativo de sub expressão desta proteína.



A TTR (do inglês *Transthyretin*) é uma proteína de 55 kDa (Saelices *et al*, 2015). A principal função desta proteína é o transporte de nutrientes e, assim sendo, a redução dos seus níveis pode implicar a redução da concentração de alguns nutrientes específicos (Schreiber *et al*, 1989). A TTR apresenta-se como uma proteína negativa de fase aguda, ou seja, os seus níveis decrescem em resposta de fase aguda, e esta proteína não aparenta apresentar nenhuma função na resposta imunitária (Schreiber *et al*, 1989; Whicher *et al*, 1992). Esta redução da TTR foi demonstrada, em pacientes infetados com malária, como sendo uma consequência da infeção de *Plasmodium* (Tabone *et al*, 1992; Thurnham *et al*, 1991). Apesar destes estudos confirmarem a redução dos níveis de TTR em pacientes infetados com malária aguda, os dados relativos à variação da quantidade de proteína presente nas diferentes amostras utilizadas neste projeto, não são indicativos de variações significativas nos seus níveis de expressão.

A HBB (do inglês *Hemoglobin subunit beta*), é uma das subunidades que constituem a hemoglobina, sendo esta um tetrâmero composto por dois pares de cadeias semelhantes entre si. A forma mais comum de hemoglobina, a HB A, é composta por duas subunidades alfa, e duas subunidades beta (Schechter, 2008). Estudos anteriores demonstraram que indivíduos com alfa-talassémia, uma condição caracterizada por uma produção deficiente de subunidades alfa de hemoglobina, e infetados com malária, demonstraram um crescimento reduzido dos parasitas de *Plasmodium* (Pattanapanyasat *et al*, 1999), assim como um aumento na capacidade de ligação de anticorpos contra esta infeção (Williams *et al*, 2002). Ainda que não tenha sido possível calcular a variação da quantidade desta proteína nas diferentes amostras, a presença desta subunidade na amostra de um indivíduo infetado com malária, e não nas restantes amostras, pode ser explicada pela rutura dos eritrócitos pelo parasita *Plasmodium*, libertando assim na corrente sanguínea o seu principal constituinte, a hemoglobina.

O designado sistema complemento desempenha um papel essencial nos mecanismos de defesa do organismo, participando de uma forma decisiva no processo inflamatório e, consequentemente, nos mecanismos de imunidade inata (Mastellos *et al*, 2003). É constituído por uma série de proteínas plasmáticas e de membrana, designadas por frações ou fragmentos do complemento, que no processo de ativação do sistema são responsáveis pela produção de vários efeitos biológicos associados à resposta imune humoral. Estes efeitos incluem a opsonização, a quimiotaxia, imunoaderência, lise celular e interação com outros sistemas (p.e. coagulação e fibrinólise) que caracterizam e fundamentam a sua importância no processo inflamatório. As proteínas ou componentes do complemento são sintetizadas sobretudo no fígado mas também pelos macrófagos tecidulares e pelos fibroplastos. O próprio processo inflamatório estimula esta síntese graças à mediação, entre outras, de duas citocinas: IL-1 e IFN-gama. Os componentes do complemento estão normalmente presentes no plasma numa forma inativa. Quando o sistema é ativado, as moléculas proteicas inativas que constituem os seus componentes são convertidas, por proteólise, em enzimas ativas que, por sua vez, adquirem capacidade de ativar o componente seguinte, estabelecendo-se uma cascata de

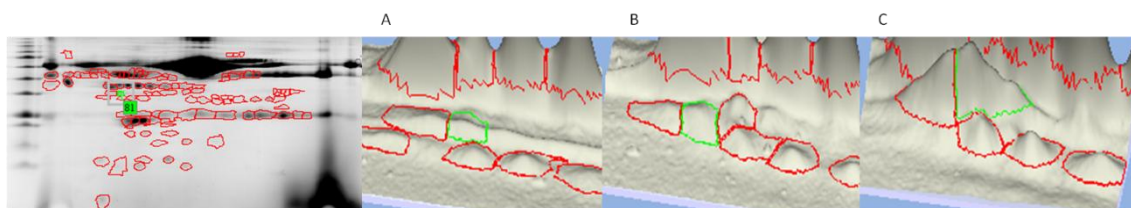
ativação, que pode ocorrer por três vias distintas (Asgari *et al*, 2014). Em indivíduos infectados por *Plasmodium sp.*, os antígenos de malária levam à ativação do sistema complemento, quer nos eritrócitos infectados, quer pelos antígenos livres em circulação após a ruptura dos eritrócitos, ou até por complexos imunitários formados por anticorpos que têm como alvo antígenos específicos (Adam *et al*, 1981; Garred *et al*, 2003; Omodeo-Sale *et al*, 2005; Wenisch *et al*, 1997). Os complementos ativos ligam-se covalentemente aos antígenos, causando a sua opsonização e posterior fagocitose por macrófagos (Astarie-Dequeker *et al*, 2010). Dado que o sistema complemento está relacionado com a resposta imunitária do sistema, poderá explicar a presença de complementos C4A e C3 nas diferentes amostras mas, apesar de estes apresentarem variações na sua quantidade entre as diferentes amostras, estas variações não são suficientemente significativas, não sendo por isso indicadoras de alterações nos níveis de expressão destas mesmas proteínas.

A IGH@ é uma proteína que corresponde a uma subunidade da família das imunoglobulinas (Torres *et al*, 2008; William *et al*, 1988). Esta subunidade corresponde à cadeia pesada da imunoglobulina, e o seu tipo define a classe de imunoglobulina (IgG, IgD, IgA, IgM e IgE) (Schroeder *et al*, 2010). Os anticorpos, glicoproteínas, pertencentes à família das imunoglobulinas, são constituídos por duas cadeias pesadas, e por duas cadeias leves. Dado papel destes anticorpos na resposta imunitária do sistema, em casos de infeção, por exemplo, pode ser assim explicada a variação da quantidade desta proteína observada, entre as diferentes amostras, neste projeto, tendo havido um ligeiro aumento da sua quantidade, mas não o suficiente para que este fosse considerado indicativo de alterações no nível de expressão destas proteínas.

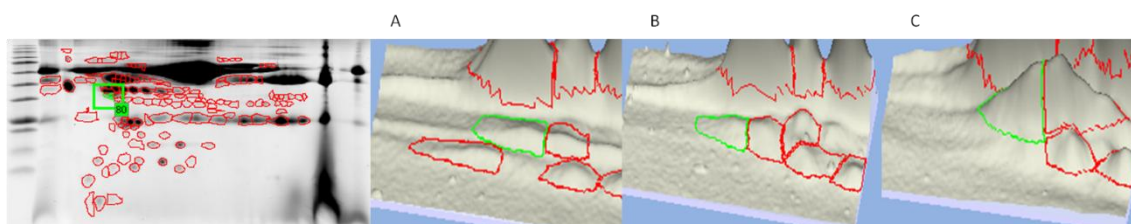
A ITIH4 (do inglês *Inter-alpha-trypsin Heavy Chain 4*) é uma glicoproteína que é expressa maioritariamente no tecido hepático (Nishimura *et al*, 1995). Esta proteína pertence à família de inibidores de proteases de serina, que desempenham diversas funções antiapoptóticas e estabilizadores de membranas, importantes durante o desenvolvimento (Fujita *et al*, 2004). Este grupo de proteínas demonstrou também o seu papel com inibidor de processos de fagocitose e de polimerização de actina (Choi-Miura *et al*, 2000), assim como o seu papel no desenvolvimento e regeneração do fígado (Bhanumathy *et al*, 2002). É assim possível que a variação de quantidade identificada neste projeto para esta proteína, esteja relacionada com as suas funções relacionadas com o desenvolvimento e regeneração do tecido hepático e, embora tenha sido registado um aumento da quantidade de ITIH4 na amostra de um indivíduo infectado com malária aguda, esta variação não é indicativa de aumento dos seus níveis de expressão.

Para além destes *spots* proteicos em que foram identificadas as proteínas correspondentes, por análise de espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF MS/MS) e PMF, foram ainda destacados, dos 51 *spots* proteicos em que foram identificadas variações significativas dos níveis de expressão destas proteínas entre a amostra de soro de um indivíduo saudável e as restantes amostras utilizadas neste projeto. Destes 51 *spots* de

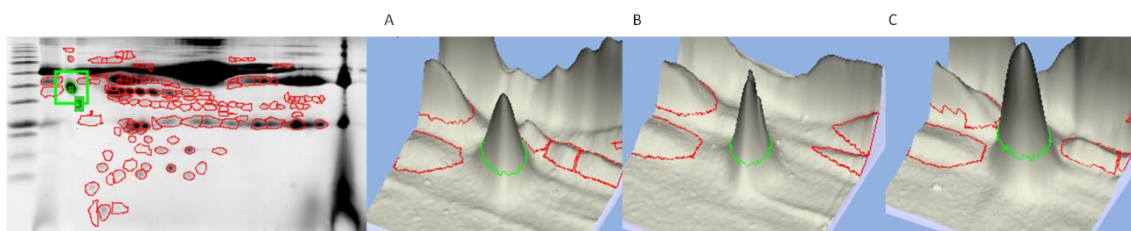
interesse, os 9 spots que correspondem a proteínas que não foram identificadas por MS e PMF podem ser visualizados nas figuras 3.19-3.28.



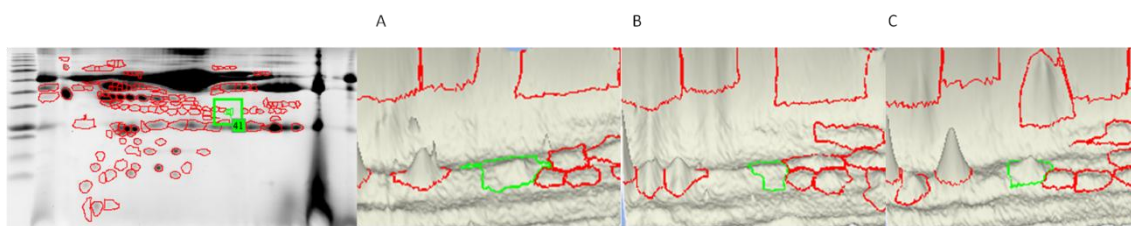
**Figura 3.20.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por eletroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 3,994, indicativo de sobre expressão desta proteína.



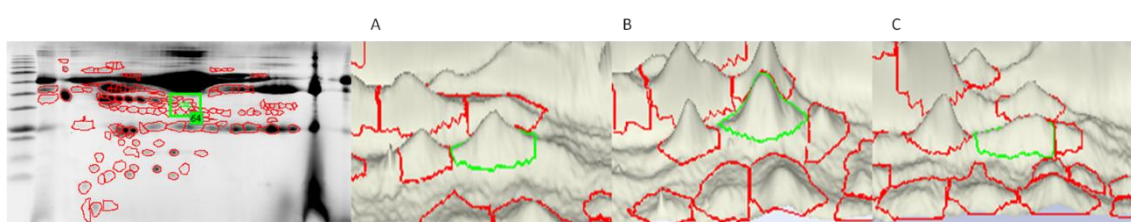
**Figura 3.21.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por eletroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 1,929, indicativo de sobre expressão desta proteína.



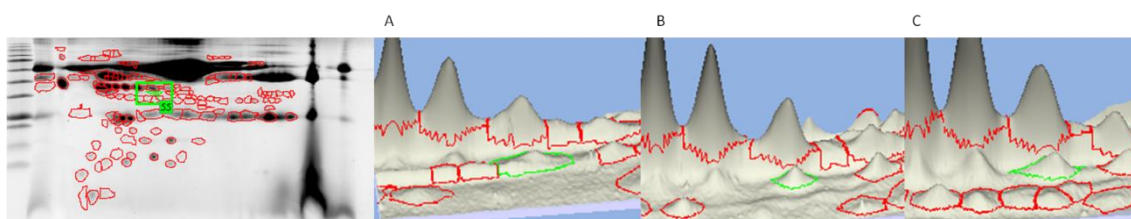
**Figura 3.22.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por eletroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 1,549, indicativo de sobre expressão desta proteína.



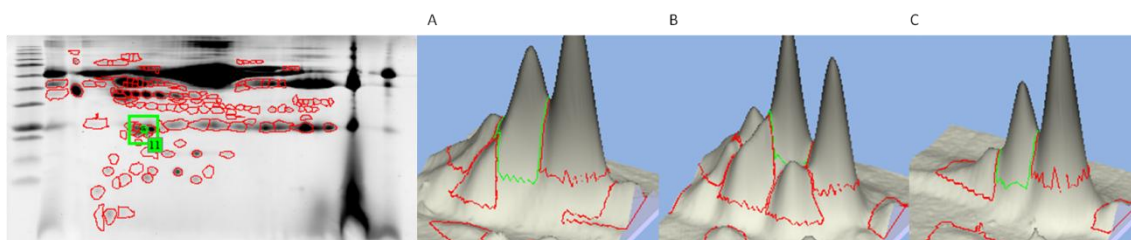
**Figura 3.23.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por eletroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 0,672, indicativo de sub expressão desta proteína.



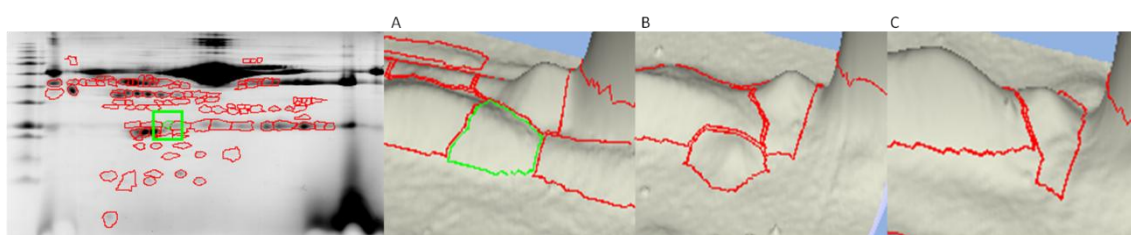
**Figura 3.24.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por eletroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 0,490, indicativo de sub expressão desta proteína.



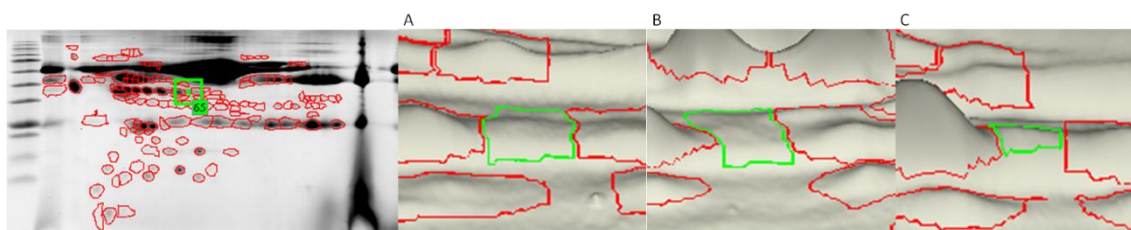
**Figura 3.25.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por eletroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 0,481, indicativo de sub expressão desta proteína.



**Figura 3.26.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por eletroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 0,355, indicativo de sub expressão desta proteína.



**Figura 3.27.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por eletroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 0,263, indicativo de sub expressão desta proteína.



**Figura 3.28.** Representação de imagens tridimensionais referentes a um dos *spots* proteicos identificados nos géis obtidos por eletroforese bidimensional, para as diferentes amostras de soros humanos. A – amostra de soro de indivíduo saudável; B – amostra de soro de indivíduo saudável, com historial clínico de malária; C – amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, por *P. falciparum*. Entre as amostras A e C foi identificada uma variação da quantidade desta proteína, correspondente a um *fold* de 0,157, indicativo de sub expressão desta proteína.



## **4. Conclusões e Perspetivas Futuras**





#### **4.1. Tratamento das Amostras, Tendo em Vista a Remoção das Proteínas de Maior Abundância Relativa e Maior Peso Molecular, Nomeadamente Albumina**

A primeira etapa deste trabalho teve como objetivo a otimização das amostras para as análises subsequentes, através da remoção das proteínas de maior abundância relativa e maior peso molecular, nomeadamente a albumina de soro humano, HSA, a proteína mais abundante na corrente sanguínea humana. Esta etapa foi considerada de grande importância, dado que a presença destas proteínas, pode impossibilitar a visualização de proteínas de menor abundância relativa, proteínas estas que podem ser importantes para a compreensão das alterações, em termos das proteínas expressas, que existem em caso de infeção de malária, causada por *Plasmodium falciparum*.

Foram testados dois métodos para otimizar esta remoção seletiva de proteínas interferentes, nomeadamente a utilização de membranas com um limite de exclusão molecular de 50 kDa e o *kit* para remoção de albumina *AlbuminOut*, da G-Biosciences.

O método baseado na utilização de Amicons Ultra-0,5, com um limite de exclusão molecular de 50 kDa, e o *kit AlbuminOut*, da G-Biosciences, utilizados isoladamente, provaram não permitir uma remoção eficiente das proteínas de maior peso molecular e abundância, como a albumina. Esta ineficiência destes métodos é provavelmente devida à saturação dos filtros e colunas dos sistemas, respetivamente, permitindo a passagem de albumina, aquando da sua utilização.

Para melhorar a eficiência desta remoção, foi testada a utilização sequencial destes dois métodos, tendo sido invertida a ordem de utilização dos mesmos. Ambas as abordagens provaram conseguir aumentar bastante a remoção destas proteínas de presença indesejada nas amostras, sendo que o método de tratamento através de Amicons Ultra-0,5 50K, seguido do *kit AlbuminOut*, demonstrou melhores resultados na remoção da albumina, possivelmente devido ao facto de a utilização dos Amicons com *cut-off* de 50 kDa, utilizado em primeiro lugar, ter permitido a remoção de uma grande quantidade de albumina das amostras, tendo assim dificultado a saturação das colunas do *kit AlbuminOut*, que foi utilizado seguidamente. Estes métodos não permitiram, no entanto, a obtenção de proteína nas amostras em quantidade suficiente para permitir a análise posterior por electroforese bidimensional.

Com o objetivo de aumentar a quantidade de proteína de cada amostra recuperada após a etapa de tratamento das mesmas, foi testada a utilização do método de Amicons Ultra-0,5, com um limite de exclusão de peso molecular de 50 kDa, tendo sido, posteriormente, efetuada uma etapa de lavagem das colunas dos Amicons, com 2x 400µL de tampão fosfato sódio, com uma concentração de 5mM e pH 7,2. Esta abordagem permitiu a remoção de grande parte das proteínas de maior abundância e peso molecular das diferentes amostras, como a obtenção de amostras com níveis de quantidade de proteína compatíveis com a realização das etapas subsequentes deste projeto, nomeadamente, a etapa de eletroforese bidimensional (2DE).

Assim sendo, o método Amicons Ultra-0,5, com um limite de exclusão molecular de 50kDa, seguido de lavagem da coluna com 2x 400µL de tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,2 foi considerado o melhor método para esta etapa de otimização das amostras.

#### **4.2. Identificação dos Spots Proteicos Excisados, Analisados por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF/TOF MS/MS), e Identificados Através da Técnica de *Peptide Mass Fingerprint***

A realização da técnica de eletroforese bidimensional, com as amostras de soros humanos gentilmente cedidas pela Dra. Fátima Nogueira, do IHMT, permitiu a obtenção de diferentes géis de poliacrilamida em que foi possível a visualização dos diferentes perfis proteicos das amostras de um indivíduo saudável, de um indivíduo saudável, com historial clínico de malária, e de um indivíduo infetado com malária aguda, provocada por *P. falciparum*. Nos referidos géis, a técnica de 2DE permitiu a separação das diferentes proteínas das amostras de acordo com o seu ponto isoelétrico, numa primeira dimensão, e de acordo com o seu peso molecular, numa segunda dimensão, através das técnicas de focagem isoelétrica e eletroforese SDS-PAGE, respetivamente.

Através de uma comparação visual entre os padrões de *spots* proteicos destas amostras, foram identificados 43 *spots* que aparentavam apresentar variações significativas na sua quantidade nos géis das diferentes amostras de soros humanos em estudo. Estes *spots* foram excisados e enviados para a o Dr. Hugo Osório, do IPATIMUP, que realizou a sua análise por espectrometria de massa pela técnica de MALDI-TOF/TOF MS/MS, ou seja, uma primeira análise MALDI-TOF/TOF, complementada com a técnica de *Tandem Mass Spectrometry* (MS/MS), com o objetivo de obter uma maior quantidade de informação acerca dos diferentes péptidos fragmentados das amostras.

Após a análise por MALDI-TOF/TOF MS/MS, as amostras foram identificadas com o recurso à técnica de *Peptide Mass Fingerprint*, tendo as sequências peptídicas, resultantes da análise de MS, sido comparadas com a base de dados da UniProt, tendo em conta dois organismos: *Homo sapiens* e *Plasmodium falciparum*, uma vez que o objetivo deste projeto foi a identificação de proteínas humanas e do organismo parasita que apenas fossem encontradas em casos de infeção de malária, assim como proteínas humanas que demonstrassem apresentar variações significativas nos seus níveis de expressão em resultado desta infeção.

Os géis de poliacrilamida resultantes da técnica de 2DE, que contêm os padrões de *spots* proteicos das amostras, foram analisados com o recurso ao *software Melanie 7*, da GeneBio, que permitiu a comparação entre os diferentes perfis proteicos das amostras, assim como a quantificação de cada *spot*, baseada na sua quantidade em volume. Para esta análise, foram manualmente retirados da análise das amostras os *spots* que correspondiam claramente a compostos não-proteicos, tendo sido eliminados os *spots* que correspondiam inequivocamente

a ruído, dado que não exibiam a forma clássica gaussiana característica de *spots* proteicos em géis de eletroforese bidimensional. Foram também eliminados os *spots* que correspondiam a proteínas com um peso molecular inferior a 50kDa, dado que as limitações impostas pela técnica de eletroforese 2D não permitem a sua análise quantitativa. Após esta etapa de eliminação dos *spots* para posterior análise, foram estabelecidas *landmarks* para os mesmos *spots*, nos padrões proteicos das diferentes amostras de soros. Após esta correspondência, foram calculados os rácios de quantidade em volume dos *spots* de cada *landmark*, entre a amostra de um indivíduo saudável, definida como amostra controlo, e as outras amostras, sendo estes rácios indicativos de variações nos níveis de expressão destas proteínas entre as diferentes amostras. Rácios inferiores a 0,7 foram considerados como sendo indicativos de sub expressão destas proteínas, e rácios superiores a 1,5 foram considerados com indicativos da sua sobre expressão.

Das proteínas analisadas por MALDI-TOF-TOF MS/MS e PMF foram identificados três grupos distintos de amostras. O primeiro grupo corresponde a proteínas que foram identificadas nas diferentes amostras de soros humanos, e que apresentavam uma variação significativa nos seus níveis de expressão, tendo sido identificadas as proteínas *alpha-1-acid glycoprotein 1* (ORM1), *apolipoprotein A-1* (APOA1), *haptoglobin* (HP), *Ig kappa chain C region* (IGKC) e *Retinol-binding protein 4* (RBP4). A ORM1 foi identificada como sendo sobre expressa em infeção de malária, confirmando o seu papel como uma proteína positiva de fase aguda. A APOA1, IGKC e RBP4 foram consideradas como sendo sub expressas em infeção de malária, estando esta redução nos seus níveis de expressão relacionados com os níveis decrescidos de lípidos em infeções de malária e com a utilização da vitamina A por parte do parasita *Plasmodium*, que ainda não é totalmente conhecida. A HP foi identificada em diferentes *spots* proteicos, tendo sido igualmente considerada como sendo sobre expressa, e sub expressa na amostra infetada com malária aguda. Estas variações podem ser explicadas porque apesar de a HP ser uma proteína positiva de fase aguda, os níveis de HP em infeções de malária foram reportados como reduzidos, possivelmente devido à formação de complexos entre a HP e a hemoglobina livre em circulação, devido à rutura dos eritrócitos pelo parasita *Plasmodium*.

O segundo grupo de proteínas identificadas em *spots* proteicos que não se encontravam presentes na amostra de soro de indivíduo saudável, mas sim na amostra de soro de indivíduo infetado com malária aguda, causada por *P. falciparum*. Este grupo é composto pelas proteínas *Proline-rich Protein 4* (PRR4) e *Hemoglobin subunit beta* (HBB). A presença destas proteínas não aparenta estar diretamente relacionada com a infeção de malária, embora a presença de HBB possa ser devida à rutura dos eritrócitos pelo parasita, característica desta infeção.

O terceiro grupo de proteínas identificadas é referente a proteínas que se encontravam nas diferentes amostras, mas que não apresentaram variações consideradas como significativas nos seus níveis de expressão, sendo estas as proteínas *transthyretin* (TTR),

*complement C4-A* (C4A), *complement C3* (C3), *Igh@ protein* (IGH@) e *inter-alpha-trypsin heavy chain 4* (ITIH4).

Foram também identificadas várias proteínas que apresentaram variações significativas nos seus níveis de expressão, mas que não foram identificadas, sendo que se destacaram nove destas proteínas.

Assim sendo, foram identificadas sete proteínas com alterações significativas nos seus níveis de expressão em infeção de malária (ORM1, APOA1, IGKC, HP, RBP4, PRR4 e HBB), assim como nove proteínas correspondentes a *spots* proteicos que não foram identificados por MS e PMF, que podem constituir proteínas de interesse para o seu estudo como biomarcadores de infeções de malária, causada por *Plasmodium falciparum*.

### 4.3. Perspetivas Futuras

Com a realização deste projeto, foram identificadas diversas proteínas como possíveis alvos de estudo para a sua utilização como biomarcadores de infeção de malária por *P. falciparum*.

Previamente à realização destes estudos, é de interesse repetir a análise proteómica destas amostras de soros humanos, para garantir que estes resultados são continuamente observados, demonstrando assim o potencial destas proteínas identificadas como possíveis biomarcadores de malária. É também de grande interesse a análise proteómica das amostras de plasmas humanos que foram obtidas no final deste trabalho, pois estas foram devidamente recolhidas e armazenadas com o objetivo de manter a integridade do conteúdo proteico das diferentes amostras, tendo sido adicionados inibidores de proteases após a recolha das amostras e posteriormente armazenadas a uma temperatura de -80°C, para garantir este objetivo de preservação das amostras. A observação dos mesmos resultados obtidos pela análise proteómica das amostras de soros humanos poderá suportar a hipótese de estas proteínas serem utilizadas como biomarcadores desta infeção em humanos.

Por fim, será também importante a identificação por análise de espectrometria de massa dos *spots* proteicos que foram identificados como apresentando variações significativas nos seus níveis de expressão em caso de infeção de malária de *P. falciparum*, podendo estas também ser consideradas como alvos de estudo para a sua posterior utilização como biomarcadores de malária e, como objetivo final, ajudar não só ao diagnóstico rápido e necessário desta doença, mas também à sua erradicação a uma escala global.

## **5. Bibliografia**

- Acções de controlo da Malária. Manual para profissionais de saúde na tenção básica, Série A, Normas e Manuais Técnicos, *DF*, **2005**
- Adam, C., Geniteau, M., Gougerot-Pocidallo, M., Verroust, P., Lebras, J., Gibert, C., Morel-Maroger, L., Cryoglobulins, circulating immune complexes, and complement activation in cerebral malaria. *Infect Immun.* 31, 530-5, **1981**.
- Aly, A.S., Vaughan, A.M. & Kappe, S.H., Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu Rev Microbiol.* 63, 195-221, **2009**
- Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., *et al*, Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*, 12, 220-4, **2006**
- Arndt, S., Bosserhoff, A.K., TANGO is a tumor suppressor of malignant melanoma. *Int. J. Cancer.* 119(12), 2812-20, **2006**
- Asgari, E., Farrar, C.A., Lynch, N., Ali, Y.M., Roscher, S., Stover, C., Zhou, W., Schwaeble, W.J., Sacks, S.H., Mannan-binding lectin-associated serine protease 2 is critical for the development of renal ischemia reperfusion injury and mediates tissue injury in the absence of complement C4. *FASEB J.* 28(9), 3996-4003, **2014**
- Assembleia Mundial de Saúde – Organização Mundial de Saúde (OMS), consultado no endereço <<http://www.afro.who.int/pt/oms-em-africa/governanca/assembleia-mundial-da-saude.html>>, em **Setembro de 2015**
- Astarie-Dequeker, C., Nigou, J., Passemar, C., Guilhot, C., The role of mycobacterial lipids in host pathogenesis. *Drug Discov Today Dis Mech.* 7(1), 33-41, **2010**
- Baker, J., *et al*, Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of Plasmodium falciparum: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. *Malaria Journal*, 1-12. **2010**
- Banerji, J., Sands, J., Strominger, J.L., Spies, T., A gene pair from the human major histocompatibility complex encodes large proline-rich proteins with multiple repeated motifs and a single ubiquitin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87(6), 2374-8, **1990**
- Banumathy, G., Singh, V., Pavithra, S.R., Tatu, U., Host chaperones are recruited in membrane bound complexes by Plasmodium falciparum. *J. Biol. Chem.* 277(6), 3902–12, **2002**
- Banumathy, G., Singh, V., Tatu, U., Host chaperones are recruited in membrane-bound complexes by Plasmodium falciparum, *J. Biol. Chem.* 77, 3902-12, **2002**
- Bartolini, A., Zammarchi, L., Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria, *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, 4, **2012**
- Baumann, H., Gauldie, J., Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol Biol Med.* 7(2), 147-59, **1990**
- Beadle, C., *et al*, Diagnosis of malaria by detection of Plasmodium falciparum HRP II antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay, *Lancet*, 343, - 564-8, **1994**

- Bell, D., Wongsrichanalai, C., Barnwell, J.W., Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved? *Nat Rev Microbiol.* 4(9), 682-95, **2006**
- Bell, S. L., Chiang, A. N., Brodsky, J. L. Expression of a malarial Hsp70 improves defects in chaperone-dependent activities in ssa1 mutant yeast. *PLOS One* 6, **2011**.
- Ben Mamoun, C., Prigge, S.T., Vial, H., Targeting the lipid metabolic pathways for the treatment of malaria. *Drug Dev Res.* 71(1), 44-55, **2010**
- Bennick, A., Salivary proline-rich proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 45(2), 83–99, **1982**
- Bhalla, A., Suri, V., Singh, V., Malarial hepatopathy. *J Postgrad Med.* 52(4):315-20, **2006**
- Bhanumathy, C.D., Tang, Y., Monga, S.P., Katuri, V., Cox, J.A., Mishra, B., Mishra, L., Itih-4, a serine protease inhibitor regulated in interleukin-6-dependent liver formation: role in liver development and regeneration. *Dev. Dyn.* 223(1), 59-69, **2002**
- Braber, S., Thio, M., Blokhuis, B.R., Henricks, P.A., Koelink, P.J., Groot Kormelink, T., Bezemer, G.F., Kerstjens, H.A., Postma, D.S., Garssen, J., Kraneveld, A.D., Redegelf, F.A., Folkerts, G., An association between neutrophils and immunoglobulin free light chains in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 185(8), 817-24, **2012**
- Bruce, J.E., Anderson, G.A., Wen, J., Harkewicz, R., Smith, R.D., Highmass-measurement accuracy and 100% sequence coverage of enzymatically digested bovine serum albumin from FTICR mass spectrum, *Anal. Chem.*, 71, 2595, **1999**
- Butler, J. M. Forensic DNA Typing: Biology, Technology and Genetics of SRT Markers. *Academic Press*, **2005**
- Centers for Disease Control and Prevention, consultado no endereço <<http://www.cdc.gov/malaria/index.html>>, em **Setembro de 2015**
- Chagnon, A., Guiguen, Y., Sutre, E., Hypocholesterolemia in malaria: an aid to diagnosis? *Semaine des Hopitaux.* 61, 2075-6, **1985**
- Chavatte, J.M., Chiron, F., Chabaud, A., Landau, I., Probable specifikations by host-vector fidelity: 14 species of Plasmodium from magpies. *Parasite.* 14 (1), 21-37, **2007**.
- Chilton, D., Malik, A.N., Armstrong, M., Kettelhut, M., Parker-Williams, J., Chiodini, P.L., Use of rapid diagnostic tests for diagnosis of malaria in the UK. *J Clin Pathol.* 59(8), 862-866, **2006**
- Choi-Miura, N.H., Takahashi, K, Yoda, M, Saito, K., Hori, M., Ozaki, H. Mazda, T., Tomita, M., The novel acute phase protein, IHRP, inhibits actin polymerization and phagocytosis of polymorphonuclear cells. *Inflamm. Res.* 49(6), 305–10, **2000**
- Côte-Real, M.; Sansonetty, F.; Ludovico, P.; Prudêncio, C.; Rodrigues, F.; Fortuna, M.; Sousa, M.; Silva, M. e Leão, C. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. *Boletim de Biotecnologia*, 71, 19-33, **2002**
- DeCyder 2D, GE Healthcare consultado no endereço <<http://www.gelifesciences.com/>>, em **Outubro de 2015**

- Delacollette, C., Van der Stuyft, P., Direct acridine orange staining is not a “miracle” solution to the problem of malaria diagnosis in the field. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 187-8, **1994**
- Delta2D, DECODON GmbH, BioTechnikum, consultado no endereço <<http://www.decodon.com>>, em **Outubro de 2015**
- Dente, L., Pizza, M.G., Metspalu, A., Cortese, R., Structure and expression of the genes coding for human alpha 1-acid glycoprotein. *EMBO J.* 6(8), 2289-96, **1987**
- Djoumessi, S., Serum lipids and lipoproteins during malaria infection. *Pathol Biol (Paris)*. 37(8), 909-11, **1989**
- Dobryszczyka, W., Biological functions of Haptoglobin-New pieces to an old puzzle. *Eur J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 35(9), 647-54, **2009**
- Dodds, E.D., et al, High mass accuracy in peptide mass fingerprinting, *Anal. Biochem.* 372, 156-166, **2008**
- Doležel, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis*, 2: 143-154, **1991**
- Doležel, J., Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*. 38 (3), 285-302, **1997**
- Dos Anjos, A. Moller, A., Ersboll, B., Finnie, C., Shahbazkia, H., New approach for segmentation and quantification of two-dimensional gel electrophoresis images, *Bioinformatics* 27 (3), 368–375, **2011**
- Faucher, J.F., Ngou-Milama, E., Missinou, M.A., Ngomo, R., Kombila, M., Kremsner, P.G., The impact of malaria on common lipid parameters. *Parasitol Res.* 88(12), 1040-3, **2002**.
- Florens, L., Liu, X.S., Wang, Y., Yang, S., Schwartz, O., Peglar, M., Yates III, D.J.C., Wu, J.R.Y., Proteomics approach reveals novel proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 135,1–11. **2004**
- Frita, R., Rebelo, M., Pamplona, A., Vigarito, A.M., Mota, M.M., Grobusch, M.P., Hanscheid,., Simple flow cytometric detection of haemozoin containing leukocytes and erythrocytes for research on diagnosis, immunology and drug sensitivity testing. *Malar J.* 31(10), 74, **2011**
- Fujita, Y., Ezura, Y., Emi, M., Sato, K., Takada, D., Iino, Y., Katayama, Y., Takahashi, K., Kamimura, K., Bujo, H., Saito, Y., Hypercholesterolemia associated with splice-junction variation of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4) gene. *J Hum Genet.* 49(1), 24-8, **2004**
- Garred, P., Nielsen, M.A., Kurtzhals, J.A.L., Malhotra, R., Madsen, H.O., Goka, B.Q., Akanmori, B.D., Sim, R.B., Hviid, L., Mannose-binding lectin is a disease modifier in clinical malaria and may function as opsonin for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Infect Immun.* 71, 5245-53, **2003**
- Garrels, J.I., The quest system for quantitative analysis of two-dimensional gels, *J. Biol. Chem.* 264 (9) (1989) 5269–5282, **1989**



- Gouado, I., Lehman, L.G., Some, I.T., Mbouyap, Y., Pankoui, M.J.B., Ejoh, A.R., Tchouanguep, M.F., Influence of malaria on the serum levels of vitamin A, zinc and calcium of children in Douala – Cameroon. *Afr J Biotechnol.* 6(7), 871-6, **2007**
- Graves, P.R., Haystead, T.A.J., Molecular Biologist ' s Guide to Proteomics Molecular Biologist ' s Guide to Proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(1), 39–63, **2002**
- Grobusch, M.P., Kremsner, P.G., Uncomplicated malaria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 295, 83-104, **2005**
- Hamzah, J., Skinner-Adams, T.S., Davis, T.M., In vitro antimalarial activity of retinoids and the influence of selective retinoic acid receptor antagonists. *Acta Trop.* 87(3), 345-53, **2003**
- Hänscheid, T., Melo-Cristino, J., Pinto, B.G., Automated detection of malaria pigment in white blood cells for the diagnosis of malaria in Portugal. *Am J Trop Med Hyg.* 64(5-6), 290-2, **2001**
- Henzel, W.J., Watanabe, C., Stults, J.T., Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 14, 931-942, **2003**
- Heukeshoven, J., Dernick, R., Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis.* 6(3), 103-12, **1985**
- Histidine Rich Protein II - Malaria in vitro consultado no endereço <<http://www.meduniwien.ac.at/user/harald.noedl/malaria/hrp2.html>>, em **Outubro de 2015**
- Hoffman, S.L., Carucci, D.J., Plasmodium falciparum: from genomic sequence to vaccines and drugs. *Novartis Found. Symp.* 229, 94–104. **2000**
- Honey, K., Tales from the gene pool: a genomic view of infectious disease. *J. Clin. Invest.* 119(9), 2452-54, **2009**
- Huang, B., Porter, G., Expression of proline-rich Akt-substrate PRAS40 in cell survival pathway and carcinogenesis. *Acta Pharmacol. Sin.* 26 (10), 1253-8, **2005**
- Hurt, N., Smith, T., Tanner, M., Mwankusye, S., Bordmann, G., Weiss, N.A., Teuscher, T., Evaluation of C-reactive protein and haptoglobin as malaria episode markers in an area of high transmission in Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88(2), 182–6, **1994**
- ImageMaster 2D, GE Healthcare, consultado no endereço <<http://www.gelifesciences.com/>>, em **Outubro de 2015**
- Imrie, H.; Fowkes, F.J.I.; Michon, P., Tavul, L.; Hume, J.C.C., Piper, K.P., Reeder, J.C., Day, K.P., Haptoglobin levels are associated with haptoglobin genotype and  $\alpha$ -Thalassemia in a malaria-endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74(6), 965–71, **2006**
- James, P., Quadroni, M., Carafoli, E., Gonnet, G., Protein Identification by mass profile fingerprinting, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195, 58-64, **1993**
- Jones, M.K., Good, M.F., Malaria parasites up close, *Nat. Med.*, 12, 170-1, **2006**
- Kakkilaya, B.S., Rapid diagnosis of malaria, *Lab. Med.*, 34, 602-8, **2003**

- Kawamoto, F. *et al*, Sequence variation in the 18S rRNA gene, a target for PCR-based malaria diagnosis, in *Plasmodium ovale* in southern Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2287-9, **1996**
- Khan, S.M., Franke-Fayard, B., Mair, G.R., Lasonder, E., Janse, C.J., Mann, M., Waters, A.P.,. Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. *Cell*, 675–687. **2005**
- Komuro, A., Saeki, M., Kato, S., , Association of two nuclear proteins, Npw38 and NpwBP, via the interaction between the WW domain and a novel proline-rich motif containing glycine and arginine. *J. Biol. Chem.* 274(51), 36513-9, **1999**
- Kosaka, T., Takawaza, T., Kubota, K., Watanabe, N., Nakamura, T., Identification of rat liver aldehyde oxidase across species by accurate peptide mass fingerprinting and sequence tagging with FTICR-MS, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 48, 179, **2000**
- Kyabayinze, D.J., Tibenderana, J.K., Odong, G.W., Rwakimari, J.B., Counihan, H. Operational accuracy and comparative persistent antigenicity of HRP2 rapid diagnostic tests for *Plasmodium falciparum* malaria in a hyperendemic region of Uganda. *Malar J.* 29(7), 221, **2008**
- Lanzer, M., Wickert, H., Krohne, G., Vincensini, L., Braun Breton, C., Maurer's clefts: A novel multi-functional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Int. J. Parasitol.* 36(1), 23–36, **2006**
- Lee, S.W., Jeon, K., Jeon, B.R., Park, I., Rapid diagnosis of vivax malaria by the SD Bioline Malaria Antigen test when thrombocytopenia is present. *J Clin Microbiol.* 46(3), 939-42, **2008**
- Luo, Z., Lei, H., Sun, Y., Liu, X., Su, D.F., Orosomucoid, an acute response protein with multiple modulating activities. *J Physiol Biochem.* 71(2), 329-40, **2015**
- Magdeldin, S., S., Zhang, Y., Xu, B., Yoshida, Y., Yamamoto,T., Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis – a practical perspective, *Gel Electrophor.– Principles Basics*, 91–116, **2012**
- Mann, M., Hojrup, P., Roepstorff, P., Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases, *Biol. Mass Spectrom.*, 22, 338-345, **1993**
- Mastellos, D., Morikis, D., Isaacs, S.N., Holland, M.C., Strey, C.W., Lambris, J.D., Complement: structure, functions, evolution, and viral molecular mimicry. *Immunol. Res.* 27, 367-86, **2003**
- Mayer, M.P., Bukau, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 670-84, **2005**
- Meier, B., Dobeli, H., Certa, U., Stage-specific expression of aldolase isoenzymes in the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol.* 52(1),15-27, **1992**
- Melanie 7.0, Bio-Rad, consultado no endereço <<http://www.genebio.com>>, em **Setembro de 2015**

- Mendonça, V. R., Barral-Netto, M., Immune responses in asymptomatic plasmodial infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110(8), 945-55, **2015**
- Messana, I., Cabras, T., Pisano, E., Sanna, M.T., Olinas, A., Manconi, B., Pellegrini, M., Paludetti, G., Scarano, E., Fiorita, A., Agostino, S., Contucci, A.M., Calò, L., Picciotti, P.M., Manni, A., Bennick, A., Vitali, A., Fanali, C., Inzitari, R., Castagnola, M., Trafficking and postsecretory events responsible for the formation of secreted human salivary peptides: a proteomics approach. *Mol. Cell. Proteomics*. 7(5), 911–26, **2008**
- Mfonkeu, J.B., Gouado, I., Kuete, H.F., Zambou, O., Combes, V., Grau, G.E., Zollo, P.H., Biochemical markers of nutritional status and childhood malaria severity in Cameroon. *Br J Nutr*. 104(6), 886-92, **2010**.
- Misra, G., Ramachandran, R., Hsp70-1 from *Plasmodium falciparum*: protein stability, domain analysis and chaperone activity, *Biophys. Chem.*, 142, 55-64, **2009**
- Mizuno, Y., Kawazu, S.I., Kano, S., Watanabe, N., Matsuura, T., Ohtomo, H., In-vitro uptake of vitamin A by *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol*. 97(3), 237–43, **2003**
- Moody, A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 66–78. **2002**.
- Moore, D.F., Rosenfeld, M.R., Gribbon, P.M., Winlove, C.P., Tsai, C.M., Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. *Inflammation* 21(1), 69–82, **1997**
- Morais, J. D., Malária em Portugal: passado, presente e perspectivas futuras Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas, 10 (2), 1-47, **2014**
- Morrison, D.A., Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends Parasitol.* 25(8), 375-82, **2009**
- Mu, A.K., Bee, P.C., Lau, Y.L., Chen, Y., Identification of Protein Markers in Patients Infected with *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*, *Int. J. Mol. Sci.* 15(11), 19952-61, **2014**
- Murray, C.K., Bell, D., Gasser, R.A., Wongsrichanalai, C., Rapid diagnostic testing for malaria. *Trop Med Int Health*. 8, 876-883, **2003**
- Murray, C.K., Bennett, J.W., Rapid diagnosis of malaria: article review. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, **2009**
- Nishimura, H., Kakizaki, I., Muta, T., Sasaki, N., Pu, P.X., Yamashita, T., Nagasawa, S., cDNA and deduced amino acid sequence of human PK-120, a plasma kallikrein-sensitive glycoprotein. *FEBS Lett.* 357(2), 207-11, **1995**
- Nyalwidhe, J., Bauermeister, S., Lingelbach, K., Proteomic approaches towards the characterisation of the parasitophorous vacuole in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Int. J. Med. Microbiol.*, 29392–29393. **2004**
- Objectivos do Milénio - Nations Regional Information Centre (UNRIC), consultado no endereço <http://www.unric.org/pt/objectivos-de-desenvolvimento-do-milenio-actualidade>, em **Setembro de 2015**

- Omodeo-Sale, F., Motti, A., Dondorp, A., White, N.J., Taramelli, D., Destabilisation and subsequent lysis of human erythrocytes induced by *Plasmodium falciparum* haem products. *Eur J Haematol.* 74(4), 324-32, **2005**
- Orimadegun, A.E., Orimadegun, B.E., Serum Apolipoprotein-A1 and Cholesterol Levels in Nigerian Children with *Plasmodium falciparum* Infection. *Med Princ Pract.* 24(4), 318-24, **2015**
- Pappin, D.J., Hojrup, P., Bleasby, A.J., Rapid identification of proteins by peptide mass fingerprinting, *Curr. Biol.*, 3, 327-332, **1993**
- Pasvol, G. Protective hemoglobinopathies and *Plasmodium falciparum* transmission, *Nat. Genet.*, 42, 284-5, **2010**
- Pattanapanyasat, K., Yongvanitchit, K., Tongtawe, P., Tachavanich, K., Wanachiwanawin, W., Fucharoen, S., Walsh, D.S., Impairment of *Plasmodium falciparum* growth in thalassemic red blood cells: further evidence by using biotin labeling and flow cytometry. *Blood.* 93, 3116-9, **1999**
- Pavithra, S. R., Kumar, R. & Tatu, U. Systems analysis of chaperone networks in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS Comput. Biol.* 3, 1701–15. **2007**
- Perkins, S.L., Austin, C.C.,. Four new species of *Plasmodium* from New Guinea Lizards: integrating morphology and Molecules. *J. Parasitol.* 95 (2), 424-33, **2009**
- Polyzoidis, S., Koletsa, T., Panagiotidou, S., Ashkan, K., Theoharides, T.C., Mast cells in meningiomas and brain inflammation. *J Neuroinflammation.* 12, 170, **2015**
- Progenesis SameSpots, Nonlinear Dynamics, consultado no endereço <<http://www.totallab.com>>, em **Setembro de 2015**
- Prudêncio, M., Rodrigues, C.D., Hannus, M., Martin, C., Real, E. *et al.* Kinome-wide RNAi Screen Implicates at Least 5 Host Hepatocyte Kinases In *Plasmodium* Sporozoite Infection, *Plos Pathogens*, 4, **2008**
- Prudêncio, M., Rodriguez A., Mota, M.M., The silent path of thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage, *Nat. Rev. Microbiology*, 4, 849-56, **2006**
- Redd, S.C., *et al*, Clinical algorithm for treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in children, *Lancet*, 347, 223-7, **1996**
- Redegeld, F.A., van der Heijden, M.W., Kool, M., Heijdra, B.M., Garssen, J., Kraneveld, A.D., Van Loveren, H., Roholl, P., Saito, T., Verbeek, J.S., Claassens, J., Koster, A.S., Nijkamp, F.P., Immunoglobulin-free light chains elicit immediate hypersensitivity-like responses. *Nat Med.* 8(7), 694-701, **2002**
- Rifai, N., Lipoproteins and apolipoproteins, composition, metabolism and associated with coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med.* 110(8), 694-701, **1986**
- Rijnierse, A., Kroese, A.B., Redegeld, F.A., Blokhuis, B.R., van der Heijden, M.W., Koster, A.S., Timmermans, J.P., Nijkamp, F.P., Kraneveld, A.D., Immunoglobulin-free light chains mediate antigen-specific responses of murine dorsal root ganglion neurons. *J Neuroimmunol.* 208(1-2), 80-6. **2009**

- Rogerson, S., What is the Relationship between Haptoglobin, Malaria, and Anaemia? *PLoS Med.* 3(5), 593-94, **2006**
- Rogowska-Wrzesinska, A., Le Bihan, M.C., Thaysen-Andersen, M., Roepstorff, P., 2D gels still have a niche in proteomics. *J Proteomics.* 88: 4–13, **2013**
- Rosenthal, P.J., How do we best diagnose malaria in Africa?, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86, 192-3, **2012**
- Rougemont, A., Bouvier, M., Perrin, L., Yerly, S., Brenner, E., et al. Hypohaptoglobinaemia as an epidemiological and clinical indicator for malaria. Results of two studies in a hyperendemic region in West Africa. *Lancet.* 24(2), 709-12, **1988**
- Saelices, L., Johnson, L.M., Liang, WY, Sawaya, M.R., Cascio, D., Ruchala, P., Whitelegge, J., Jiang, L., Riek, R., Eisenberg, D.S., Uncovering the Mechanism of Aggregation of Human Transthyretin. *J Biol Chem*, 290(48), 28932-43, **2015**
- Sanders, P.R., Gilson, P.R., Cantin, G.T., Greenbaum, D.C., Nebl, T., Carucci, D.J., McConville, M.J., Schofield, L., Hodder, A.N., Yates III, J.R., Crabb, B.S., Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in raft like membranes of *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 280, **2005**
- Sasaki, H., Yoshioka, N., Takagi, Y., Sakaki, Y., Structure of the chromosomal gene for human serum prealbumin. *Gene.* 37(1-3), 191-7, **1985**
- Savelonas, M., Mylona, E., Maroulis, D., Unsupervised 2D-gel electrophoresis image segmentation based on active contours, *Pattern Recognit.* 45 (2), 720–731, **2012**
- Schechter, A.N., Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood.* 112(10), 3927-38, **2008**
- Schreiber, G., Tsykin, A., Aldred, A.R., Thomas, T., Fung, W.P., Dickson, P.W., Cole, T., Birch, H., De Jong, F.A., Milland, J., The acute phase response in the rodent. *Ann N Y Acad Sci.* 557, 61-85, **1989**
- Schroeder Jr, H.W., Cavacini, L., Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 125(2 0 2), 41-52, **2010**
- SDS-PAGE , 2001, consultado no endereço <[https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse\\_Information/4581/techniques/gel\\_elect/page\\_protein.html](https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html)>, em **Setembro de 2015**
- Sharma, Y. D. Structure and possible function of heat-shock proteins in falciparum malaria. *Comp. Biochem. Physiol.* 102, 437–444. **1992**
- She, R.C., Rawlins, M.L., Mohl, R., Perkins, S.L., Hill, H.R., Litwin, C.M., Comparison of immunofluorescence antibody testing and two enzyme immunoassays in the serologic diagnosis of malaria, *Journal of Travel Medicine*, 14(2), 105-111, **2006**
- Shonhai, A., Boshoff, A. & Blatch, G. L. The structural and functional diversity of Hsp70 proteins from *Plasmodium falciparum*. *Protein Sci.* 16, 1803–18 ,**2007**
- Silva, E.Z., Jamur, M.C., Oliver, C., Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem.* 62(10), 698-738, **2014**

- Singh, N., Valecha, N., Sharma, V.P., Malaria diagnosis by field workers using an immunochromatographic test, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91, 396-7, **1997**
- Skinner-Adams, T., Barrett, H., Davis, T.M., Heterogeneous activity in vitro of vitamin A (retinol) in combination with novel and established antimalarial drugs. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 93(5), 550-1, **1999**
- Smith, E.M., Jorgensen, A.L., Midgley, A., Oni, L., Goilav, B., Putterman, C., Wahezi, D., Rubinstein, T., Ekdawy, D., Corkhill, R., Jones, C.A., Marks, S.D., Newland, P., Pilkington, C., Tullus, K., Beresford, M.W., International validation of a urinary biomarker panel for identification of active lupus nephritis in children. *Pediatr Nephrol.* **2016**
- Stefan, H.I.K., Karine, K., Kai,M., The plasmodium sporozoite journey: a rite of passage, *Nature*, 19, 3, **2004**
- Sturm, A., Amino, R., Van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., *et al.*, Manipulation os Host Hepatocytes by the Malaria parasite for delivery into liver sinusoids, *Science*, 313, 1287-90, **2006**
- Tabone, M.D., Muanza, K., Lyagoubi, M., Jardel, C., Pied, S., Amedee-Manesme, O., Grau, G.E., Mazier, D., The role of interleukin-6 in vitamin A deficiency during Plasmodium falciparum malaria and possible consequences for vitamin A supplementation. *Immunology* 75(3), 553-4, **1992**
- Tanaka, R., *et al*, A novel enhancement assay for immunchromatographic test strips using gold nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385, 1414-20, **2006**
- Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P., Krudsood, S., Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean J. Parasitol*, 47(2), 93-102, **2009**
- Thurnham, D.I., Singkamani, R., The acute phase response and vitamin A status in malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 85(2), 194-9, **1991**
- Torres, R.M., Imboden, J., Schroeder, H.W., Antigen receptor genes, gene products, and co-receptors. *Clinical Immunology: Principles and Practice*. 3 ed. London: Mosby Elsevier; 53–77,**2008**
- Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I., Prabhu,R.M., Clinical Review: severe malaria, *Crit. Care*, 7, 315-23, **2003**
- Tuteja, R., Malaria: an overview, *FEBS J.* 274(18), 4670-79, **2007**
- Vincensini, L., Richert, S., Blisnick, T., van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Rabilloud, T., Braun Breton, C., Proteomic analysis identifies novel proteins of the Maurers clefts, a secretory compartment delivering Plasmodium falciparum proteins to the surface of its host cell. *Mol. Cell. Proteomics* 4.4, 582–593. **2005**
- Vincensini, L., Richert, S., Blisnick, T., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Rabilloud, T., Braun Breton, C. Proteomic analysis identifies novel proteins of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering Plasmodium falciparum proteins to the surface of its host cell. *Mol. Cell. Proteomics*. 4(4) 582–93, **2005**
- Wahlgren, M., Berzins, K., Perlmann, P., Bjorkman, A., Characterization of the humoral immune response in Plasmodium falciparum malaria: Estimation of antibodies to P.

- falciparum or human erythrocytes by means of micro-ELISA, *Clinical and Experimental Immunology*, 54(1), 127-134. **1983**.
- Weiss, W., Weiland, F., Görg, A., Protein Detection and Quantitation Technologies for Gel-Based Proteome Analysis. *Methods Mol Biol.* 564, 59-82, **2009**
  - Wenisch, C., Spitzauer, S., Florris-Linau, K, Rumpold, H., Vannaphan, S., Parschalk, B., Graninger, W., Looareesuwan, S., Complement activation in severe Plasmodium falciparum malaria. *Clin Immunol Immunopathol.* 85(2), 166-71, **1997**
  - Whicher, J.T., Westacott, C.I., The acute phase response. In Biochemistry of inflammation. Boston: *Kluwer Academic Publishers*, 243–69, **1992**
  - Williams, A.F., Barclay, A.N., The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 381-405, **1988**
  - Williams, T.N., Weatherall, D.J., Newbold, C.I., The membrane characteristics of Plasmodium falciparum-infected and -uninfected heterozygous alpha(0)thalassaemic erythrocytes. *Br J Haematol.* 118, 663-670, **2002**
  - Williamson, M.P., The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* 297, 249-60, **1994**
  - Wilson, M.L., Malaria rapid diagnostic tests, *Clin. Infect. Dis.*, 54, 1637-41, **2012**
  - Winger, B.E., Campana, J.E., Characterization of combinatorial peptide libraries by electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 10, 1811, **1996**
  - World Malaria Report 2014, World Health Organization, **2015**
  - World Malaria Report 2015, World Health Organization, **2016**
  - Xiao, K., Su, L., Yan, P., Han, B., Li, J., Wang, H., Jia, Y., Li, X., Xie, L.,  $\alpha$ -1-Acid glycoprotein as a biomarker for the early diagnosis and monitoring the prognosis of sepsis. *J Crit Care.* 30(4), 744-51, **2015**
  - Yamauchi, L.M., Coppi, A., Snounou, G., Sinnis, P., Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cellular Microbiology*, 9, 1215-22, **2007**
  - Yates III, J.R., Speicher, S., Griffin, P.R., Hunkapiller, T., Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification, *Anal. Biochem.*, 214, 397-408, **1993**





## **6. Anexos**



**Anexo 1.** Composição dos géis de poliacrilamida utilizados para a técnica de eletroforese SDS-PAGE, para géis de 5% e 10% de poliacrilamida.

**Gel de 5% de poliacrilamida**

2,1 mL H<sub>2</sub>O Mili-Q  
0,5 mL 30% Acrylamide Mix (37,5:1)  
380 µL 1,0M Tris-HCl pH 6,8  
30 µL 10% (p/v) Persulfato de amónia  
30 µL 10% (p/v) SDS  
3 µL TEMED

**Gel de 10% de poliacrilamida**

2,0 mL H<sub>2</sub>O Mili-Q  
1,7 mL 30% Acrylamide Mix (37,5:1)  
1,3 mL 1,5M Tris-HCl pH 8,8  
50 µL 10% (p/v) Persulfato de amónia  
50 µL 10% (p/v) SDS  
2 µL TEMED

**Anexo 2.** Curva de calibração, construída através de padrões de albumina de soro bovino (BSA), de 125, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL de quantidade desta proteína, utilizada para o cálculo das quantidades de proteína das diferentes amostras, através do método *Pierce 660nm Protein Assay Kit*, ThermoScientific.

